

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Klinik für Herz- und Gefäßchirurgie
Deutsches Herzzentrum München des Freistaates Bayern
Klinik an der Technischen Universität München
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. R. Lange)

Entwicklung und Etablierung eines artifiziellen Perfusionssystems zur Untersuchung der "venous bypass graft disease"

Christian Tesche

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität
München zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Medizin
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. E. J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. Priv.-Doz. Dr. M. Krane
2. Univ.-Prof. Dr. R. Lange

Die Dissertation wurde am 21.02.2014 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 22.10.2014 angenommen.

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

S. Dummler, S. Eichhorn, C. Tesche, U. Schreiber, B. Voss, M. A. Deutsch, H. Hauner, H. Lahm, R. Lange, and M. Krane, 'Pulsatile Ex Vivo Perfusion of Human Saphenous Vein Grafts under Controlled Pressure Conditions Increases Mmp-2 Expression', *Biomed Eng Online*, 10 (2011), 62.

Inhalt

1 Einleitung	5
1.1 Koronare Herzerkrankung und aortokoronare Bypass-Operation	5
1.2 "Venous bypass graft disease"	6
1.3 Matrixmetalloproteinasen	8
1.4 TIMPs.....	11
1.5 Artificielle Perfusionssysteme.....	12
1.6 Fragestellung	13
2 Material und Methoden.....	14
2.1 Technischer Aufbau des artifiziellen Perfusionssystems.....	14
2.1.1 Teilsysteme	14
2.1.2 Heizung und Gehäuse.....	14
2.1.3 Perfusionskreislauf	15
2.1.4 Druckregelkreis	16
2.1.5 Kontroll-Steuereinheit und Software	16
2.2 Probenmaterial	17
2.2.1 Aufbereitung der Gefäßproben	17
2.2.2 Einbringen der Gefäßproben in das artificielle Perfusionssystem	18
2.3 Reagenzien und Geräte für die molekularbiologischen Untersuchungen	19
2.4 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid-Assay	19
2.5 Analyse auf histologischer Ebene	19
2.6 Untersuchung der Genexpression	21
2.6.1 RNA-Isolierung und Aufbereitung	21
2.6.2 DNase-Verdau der RNA	22
2.6.3 Konzentrationsmessung der RNA.....	22
2.6.4 Umschreibung der RNA in cDNA.....	22
2.6.5 Real-Time-quantitative Polymerase-Chain-Reaction (qRT-PCR).....	23
2.7 Analyse auf Proteinebene.....	28
2.7.1 Zymographie	28
2.7.2 Proteinisolierung.....	28
2.7.3 Proteinkonzentrationsbestimmung mit der Bicinchoninsäure-Reaktion.....	29
2.7.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) für die Zymographie.....	29
2.7.5 Aktivitätsnachweis der Proteine	31
2.8 Statistische Analyse.....	32
3 Ergebnisse	33
3.1 Vorversuche Artificielles Perfusionsmodell	33
3.1.1 Entwicklung und Optimierung des artifiziellen Perfusionssystems	33

3.1.2 Einfluss verschiedener Flussprofile auf die Überlebensfähigkeit humaner Venenproben.....	42
3.1.3 MTT-Assay zur Vitalitätsmessung der Gruppen A und B	44
3.2 Ergebnisse der Histologie	46
3.3 Molekularbiologische Daten.....	49
3.3.1 Expressionsanalyse auf mRNA-Ebene	49
3.3.2 Ergebnisse der Zymographie.....	61
4 Diskussion.....	68
4.1 Entwicklung und Etablierung des artifiziellen Perfusionssystems.....	69
4.2 Anforderungen und Aufbau des artifiziellen Perfusionssystems.....	70
4.3 Probenmaterial	70
4.4 Technischer Aufbau des artifiziellen Perfusionsmodells.....	71
4.4.1 Perfusionskreislauf	71
4.4.2 Heizung und Gehäuse	73
4.4.3 Druckregelkreis	73
4.4.4 Kontroll-Steuereinheit und Software	74
4.5 MTT-Assay zur Vitalitätsmessung.....	74
4.6 Histologische Untersuchungen	76
4.7 Expression von MMP-2 und den korrespondierenden TIMPs	77
4.7.1 MMP-2-Expression und Aktivität.....	79
4.7.2 TIMP-Expression und Verhältnis des MMP-2/TIMP-2-Komplexes	80
4.8 Möglichkeiten und Limitationen des artifiziellen Perfusionssystems.....	83
4.9 Ausblick.....	85
5 Zusammenfassung	86
6 Literaturverzeichnis	89
7 Abkürzungsverzeichnis.....	98
8 Tabellen- und Abbildungsverzeichnis	99
9 Anhang.....	102
9.1 Patientendaten	102
9.2 Übersicht über die Matrixmetalloproteinasen	103
9.3 Reagenzien und Geräte für die molekularbiologischen Untersuchungen	104
9.3.1 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid-Assay (MTT-Test) ..	104
9.3.2 Histologie	104
9.3.3 Zymographie	105
9.3.4 Quantitative Real-Time-Polymerase-Chain-Reaction (qRT-PCR)	106
9.3.5 Geräte und Materialien	107
10 Danksagung	108

1 Einleitung

1.1 Koronare Herzerkrankung und aortokoronare Bypass-Operation

In den westlichen Industrienationen zählen die arteriosklerotisch bedingte koronare Herzerkrankung (KHK) und deren Komplikationen zu den führenden Todesursachen. Im Jahr 2010 beruhten circa 40% der Todesfälle auf Erkrankungen des Herzkreislaufsystems, wobei etwa jeder sechste Todesfall auf einen Myokardinfarkt zurückzuführen ist (Statistisches Bundesamt, Datenreport 2011). Unter der KHK versteht man die atherosklerotisch bedingte Verengung der Koronararterien, wodurch es nachfolgend zu einer Koronarinsuffizienz mit Ausbildung einer akuten Myokardischämie kommt. Bei der Therapie des akuten Myokardinfarktes auf dem Boden einer koronaren Herzerkrankung stellt die aortokoronare Bypass-Operation (ACB) durch Anlage autologer arterieller und venöser Bypassgrafts neben kardiologisch-interventionellen Verfahren wie der Ballondilatation und Stentimplantation hierbei das wichtigste Therapieverfahren dar. Insbesondere bei komplexen Mehrgefäßerkrankungen mit Beteiligung des Hauptstammes tritt die chirurgische Myokardrevaskularisation als Therapie der Wahl in den Vordergrund (Bravata et al.; 2007; Hannan et al.; 2005).

Die chirurgische Therapie der KHK stellt seit den 1960er Jahren eine Behandlungsform mit hoher und langanhaltender Erfolgsquote dar. Favaloro war 1967 der erste Operateur, der mittels interponierten Vena-saphena-magna-Transplantat eine direkte Revaskularisation einer rechten Koronararterie erfolgreich durchführte (Favaloro, 1968). Bereits Mitte der 1940er Jahre verpflanzte Arthur Vineberg die linke A. thoracica interna direkt in das linksventrikuläre Myokard (Vineberg et al.; 1955). Dem russischen Kollegen Vasilii Kolesov gelang 1964 die erste erfolgreiche Anastomosierung einer Koronararterie mit der A. thoracica interna (Kolesov et al.; 1965). Der aortokoronare Venenbypass (ACVB) wurde in der Folgezeit bei herzchirurgischen Mehrfacheingriffen wie Klappenoperationen und schließlich auch als Notfalleingriff bei akutem Myokardinfarkt etabliert und hat sich in der operativen Technik seither stetig weiterentwickelt. (Favaloro, 1969; Favaloro, 1971; Carpentier et al.; 1973).

Die aortokoronare Bypass-Operation stellt in Deutschland mit über 60.000 Eingriffen jährlich die häufigste herzchirurgische Intervention dar. Bei etwa 98% dieser Revaskularisationen kommt die Vena saphena magna als Gefäßtransplantat zum

Einsatz. Trotz enormer Fortschritte der operativen Rekonstruktionsverfahren und medikamentöser Therapiestrategien konnte die Langzeitprognose aortokoronarer venöser Bypässe nicht wesentlich verbessert werden. So zeigt sich, dass bereits ein Jahr nach Implantation 25 % der venösen Bypässe eine Okklusion aufweisen und nach 10 Jahren 50 % der Grafts verschlossen sind und 25 % multiple Stenosen besitzen (Campeau et al.; 2009; Fitzgibbon et al.; 1996; Bourassa, 1991).

1.2 “Venous bypass graft disease“

Die “venous bypass graft disease“ (VBGD) beschreibt die im zeitlichen Verlauf nach Implantation in das arterielle System auftretende Stenosierung und Okklusion venöser humaner Bypassgrafts bis hin zum funktionellen Versagen der Gefäßimplantate (Motwani et al., 1998). Hierbei können die Venengrafts drei verschiedene pathologische Entitäten durchlaufen: Graftthrombose – Entwicklung intimaler Hyperplasie – Graft-Atherosklerose. Ursächlich für den Ausfall der Gefäßtransplantate sind verschiedene spezielle Einflussfaktoren und Pathomechanismen, die bereits vor Implantation der Bypassgrafts beginnen und nach erfolgter Arterialisierung mit der Zeit fortschreiten. Bereits intraoperativ kommt es durch die chirurgische Präparation und Entnahme der Bypassgrafts mit Durchtrennung der Vasa vasorum und Entfernung der Gefäßadventitia sowohl zur mechanischen Verletzung als auch zur Ausbildung einer Ischämie und Hypoxie des Gefäßendothels (Wilson et al., 1997; Roubos et al., 1995; Davies et al., 1994). Des Weiteren werden durch diese mechanische Manipulation extrazelluläre Matrixproteine und glatte Muskelzellen (SMCs=smooth muscle cells) aktiviert (Johnson et al., 2001). Durch die Implantation in das arterielle Gefäßsystem mit seinen spezifischen hämodynamischen Eigenschaften sind die Bypassgrafts unphysiologischen Druck- und Flussbedingungen im Vergleich zur venösen Situation ausgesetzt, welche die Schädigung des Endothels erhöhen (Soyombo et al., 1993; Hinokiyama et al., 2006). Die Verletzung des Gefäßendothels ist die Voraussetzung für die Aktivierung zahlreicher zellulärer und humoraler Mechanismen, die entscheidend zur Entstehung der “venous bypass graft disease“ beitragen.

Dabei ist zu beachten, dass die venösen Bypassgrafts einer zeitabhängigen Entwicklung bezüglich der Stenosierung unterliegen, die sich in den unterschiedlichen Verschlussraten der Grafts über die Zeit widerspiegelt. Innerhalb

des ersten Monats nach Implantation okkludieren bis zu 15 % der Gefäßtransplantate auf dem Boden eine Graftthrombose (Cox et al., 1991; Wilentz et al., 1987). Durch die Schädigung des Endothels kommt es zur Adhäsion und Aggregation von Thrombozyten und zur Aktivierung des Gerinnungssystems mit anschließender Thrombosierung der Gefäßtransplantate (Verrier et al., 1996).

Die Ausbildung von intimaler Hyperplasie stellt den pathologischen Prozess zwischen dem ersten Monat und dem ersten Jahr nach Arterialisierung dar, der sowohl zur direkten Okklusion der Bypassgrafts führen kann als auch darüber hinaus als Prädisposition für die nachfolgende Entwicklung der Graft-Atherosklerose anzusehen ist (Stary et al., 1994). Die fibrointimale Hyperplasie führt bei 15 bis 20 % der Bypassgrafts innerhalb des ersten Jahres zum Gefäßverschluss (Mehta et al., 1997). Ausgelöst wird die Entwicklung intimaler Hyperplasie durch Sekretion von Wachstumsfaktoren und Zytokinen aus aktivierten Thrombozyten und den Endothelzellen (Ishiwata et al., 1997). Diese biogenen Substanzen führen zur Aktivierung glatter Muskelzellen, die zur Differenzierung, Proliferation und Migration angeregt werden. Die aktivierten SMCs bilden verstärkt extrazelluläre Matrix (ECM) und sezernieren Matrix-degradierende Enzyme wie die Matrixmetalloproteinasen (MMPs), welche für den Ab- und Umbau extrazellulärer Matrixstrukturen verantwortlich sind. Folglich kommt es durch die Umstrukturierung und verstärkte Bildung von ECM zu einer progredienten Zunahme der Neointima und zur Reduktion der Zelldichte (Allaire et al., 1997).

Darüber hinaus dominiert in den Folgejahren nach Bypassanlage die Graft-Atherosklerose als pathologischer Gefäßprozess. Analog zur Entstehung der primären Atherosklerose im arteriellen Gefäßsystem kommt es bei der Venengraft-Atherosklerose zur Einwanderung von Entzündungszellen und zur Infiltration von Blutilipiden in den subendothelialen Raum mit Ausbildung eines venös-atherosklerotischen Plaques (Dietrich et al., 2000; Ratliff et al., 1989). Durch die Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen, welche vermehrt Lipide und Cholesterinester einlagern, entstehen Schaumzellen. Diese werden apoptotisch und der Zelldetritus lagert sich in der Gefäßintima ab und ist als "fatty streaks" makroskopisch sichtbar. Dieser *circulus vitiosus* setzt sich durch weitere Makrophagenakkumulation fort und die inflammatorischen Prozesse am Gefäßendothel erhalten sich selber (Galis et al., 1994). Im Gegensatz zur arteriellen Atherosklerose sind die venösen Plaques jedoch eher konzentrisch und diffus im

Gefäß angeordnet und die fibröse Kappe ist weniger stark entwickelt, was zu einer verstärkten Vulnerabilität führt. Des Weiteren weisen die Venen eine erhöhte Lipidaufnahme und einen gesteigerten Lipidstoffwechsel auf (Peykar et al., 2004; Silca et al., 1994). Dies führt zu einer unterschiedlich schnellen Entstehung atherosklerotischer Plaques in arteriellen und venösen Gefäßen. Während die Entstehung der primären Atherosklerose im arteriellen System sich schleichend über einen Zeitraum von mehreren Jahrzehnten erstreckt, zeigt die Entwicklung der "Bypass graft disease" eine beschleunigte Läsionskinetik, welche innerhalb von Monaten bis zu wenigen Jahren zu akuten klinischen Symptomen führen kann (Bulkley et al., 1977).

1.3 Matrixmetalloproteinasen

Die extrazelluläre Matrix (ECM) spielt eine entscheidende Rolle für die Morphologie, Reparations- sowie Ab- und Umbauvorgänge im vaskulären Gewebe. Sie unterliegt einem ständigen Wandel durch veränderte Synthese und Degradation von Matrixmolekülen. Umgestaltungen der ECM finden jedoch nicht nur unter physiologischen Bedingungen statt, sondern treten auch im Rahmen pathologischer Prozesse wie atherosklerotischer Gefäßveränderungen, Herzversagen und Aneurysmata auf (Newby, AC, 2005; Loftus et al., 2002). Vermittelt werden diese Umstrukturierungsprozesse der ECM durch Matrix-degradierende Enzyme, den Matrixmetalloproteinasen. Aufgrund ihrer funktionellen und strukturellen Eigenschaften werden sie zu der Subfamilie der Zinkmetalloproteinasen, auch als Matrixine bezeichnet, zusammengefasst (Chen et al., 2005; Hamacher et al., 2004). Basierend auf ihrer Substratspezifität zu extrazellulären Matrixproteinen werden sie in die Untergruppen der Kollagenasen (MMP-1, -8, -13, -18), Gelatinasen (MMP-2, -9), Stromelysine (MMP-3, -10), Matrilysine (MMP-7, -26, -11), die Membrantyp-MMPs und weitere MMPs eingeteilt (Woessner et al., 1994; Nagase et al., 2006). Eine Auflistung der Funktion und Größe der verschiedenen MMPs findet sich in einer Tabelle im Anhang (Tabelle 13).

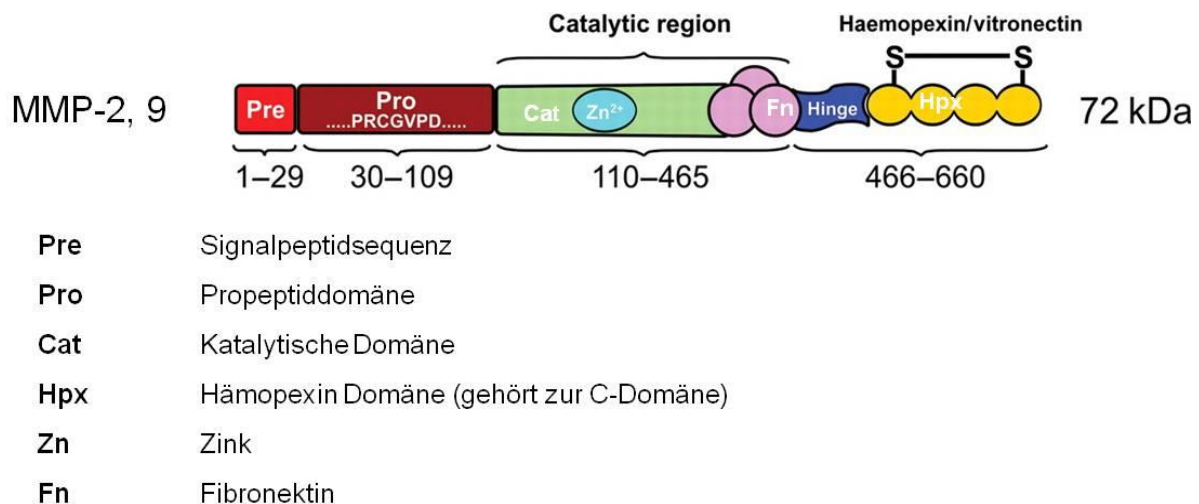


Abbildung 1: Domänenstruktur einer Matrixmetalloproteinase am Beispiel des MMP-2 und MMP-9 (Tan und Liu, 2012)

Die MMPs zeichnen sich durch eine gemeinsame einheitliche Domänenstruktur aus (Abbildung 1):

1. Signalpeptidsequenz; lokalisiert das Translationsprodukt auf dem endoplasmatischen Retikulum
2. Propeptiddomäne; wird für Enzymaktivität abgespalten
3. katalytische Domäne; diese bindet das für die Aktivität der Proteinase benötigte Zinkion
4. C-terminale Domäne; hier erfolgt die Komplexbildung der Proenzymform mit dem spezifischen Inhibitor

Die Matrixmetalloproteinasen MMP-2 und -9 verfügen darüber hinaus über eine weitere Strukturdomäne, die Gelatine als spezifisches Substrat bindet. Synthetisiert und sezerniert werden die Matrixmetalloproteinase von diversen Zellen als inaktive Vorstufen (pro-MMPs), welche durch proteolytische Spaltung in ihre aktive Form überführt werden. Vermittelt wird dieser Vorgang durch Plasmin, Sauerstoffradikale oder chemische Agenzien (Crawford, 1996; Spinale, 2002). Pro-MMP-2 hat bei der Überführung in die aktive Isoform eine Sonderstellung, da es vor allem an der Zelloberfläche durch das membranständige Protein Membran-Typ-MMP aktiviert wird (Visse und Nagase, 2003).

In der vorliegenden Studie wurde im Anschluss an die Etablierung des artifiziellen Perfusionssystems die Genexpression von MMP-2 und den korrespondierenden TIMPs (tissue inhibitor of metalloproteinases) untersucht. Proteolytische Enzyme wie die Matrixmetalloproteinasen und ihre Inhibitoren (TIMPs) spielen eine zentrale Rolle in Ab- und Umbauvorgängen der extrazellulären Matrix sowie bei der Migration von glatten Muskelzellen in die Gefäßintima von vaskulärem Gewebe. Dieses Gefäßremodeling mit Ausbildung von intimaler Hyperplasie und späterer Graft-Stenose erfolgt im Anschluss an die Implantation venöser Bypassgrafts in den arteriellen Kreislauf im Rahmen von aortokoronaren Bypass-Operationen (Davies et al., 1994; Motwani et al., 1998; Southgate et al., 1999; Porter et al., 1999; Newby et al., 2005). Ausgelöst wird diese Kaskade durch Endothelverletzungen durch die Venenentnahme und die veränderten hämodynamischen Einflüsse auf die Venengrafts im arteriellen System. Über die Aktivierung und Ausschüttung von Wachstumsfaktoren kommt es zur Aktivierung glatter Muskelzellen, welche wiederum für die Bildung und Sekretion von Matrixmetalloproteinasen und einer Zunahme der extrazellulären Matrix verantwortlich sind (Motwani et al., 1998, Galis et al., 1994; Hassantash et al., 2008). Eine wichtige Funktion kommt hierbei der Matrixmetalloproteinase-2 (MMP-2) zu, welche durch Abbau der Basalmembran und weiterer Bestandteile der extrazellulären Matrix die Migration glatter Muskelzellen begünstigt und in der Neointima von Gefäßen und Graft-Stenosen nachgewiesen werden konnte (Loftus et al., 2002; Mavromatis et al., 2000; Whatling et al., 2004; Porter et al., 1998; George et al., 1998). MMP-2 wird als Proenzym synthetisiert und liegt als inaktive Vorstufe an dem Zelloberflächenprotein MT1-MMP (Membran-Typ1-MMP) gebunden vor. Durch Serinproteasen und MT1-MMP wird das Proenzym in seine aktive Form überführt. Unspezifische TIMPs, α_2 -Makroglobulin und insbesondere das Verhältnis von MMP-2/TIMP-2 regeln hierbei den Grad der Aktivierung von MMP-2 durch irreversible Bindung von TIMP-2 an den MT1-MMP/MMP-2-Komplex und beeinflussen somit die Um- und Abbauprozesse der extrazellulären Matrix (Visse et al., 2003; Nagase et al., 1999, Murphy et al., 1995). Mit Hilfe des neu entwickelten artifiziellen Perfusionssystems sollten die Einflüsse verschiedener Druck- und Perfusionsprofile auf die Expression und Aktivität von MMP-2 und den korrespondierenden TIMPs in humanen venösen Bypassgefäßen untersucht werden.

1.4 TIMPs

Die Aktivität der Matrixmetalloproteinasen wird durch Mediatoren wie Zytokine, Wachstumsfaktoren, Hormone und Zell-Zell-Kontakt gesteuert. Eine zusätzliche und wichtige Regulierung erfolgt durch zwei Haupttypen von endogenen Inhibitoren, den α 2-Makroglobulinen und TIMPs (tissue inhibitor of metalloproteinases) (Visse et al., 2003; Nagase et al., 2006, 1999). In flüssigen Medien erfolgt eine Regulation der MMPs vor allem durch unspezifische α 2-Makroglobuline (Birkedal-Hansen et al., 1993; Cawston et al., 1986). Dem gegenüber zeigen TIMPs ihre essentielle inhibierende Wirkung vor allem an der Zelloberfläche und im Bereich der extrazellulären Matrix. Bisher konnten bei den Wirbeltieren vier Subtypen von TIMPs identifiziert werden (TIMP-1, -2, -3 und -4) (Visse et al., 2003; Nagase et al., 2006, 1999). Ihre Expression ist sowohl bei der embryonalen Entwicklung, als auch im Gewebe-Remodeling reguliert. Änderungen der TIMP-Regulation und damit der Proteinaktivität haben eine direkte Auswirkung auf die Aktivität der Matrixmetalloproteinasen. Unter physiologischen Bedingungen herrscht ein ständiges Fließgleichgewicht zwischen Auf- und Abbauvorgängen der extrazellulären Matrix. Im Rahmen von pathologischen Prozessen, z.B. dem Gefäß-Remodeling, kommt es zu einer Verschiebung dieses Gleichgewichtes in Richtung einer verstärkten Aufregulation und Aktivität der Matrixmetalloproteinasen und somit zu verstärkten Abbau- und Umbauprozessen der ECM.

Die TIMPs sind Polypeptide mit einer Molekülmasse von 20-30kDa, welche in ihrer Aminosäuresequenz zu ~40-50% homolog sind (Dollery et al., 1995). Alle vier TIMPs zeichnen sich durch zwölf Cystinreste aus, welche durch Ausbildung von sechs Disulfidbrücken für die Tertiärstruktur der Moleküle wesentlich sind. Das mit den MMPs interagierende Ende ist hierbei für die Spezifität der MMP-Inhibition entscheidend (Gomez et al., 1997). Die Regulation der MMPs erfolgt, indem TIMPs 1:1 stöchiometrisch mit hoher Affinität an das aktive Zentrum der MMPs binden und dadurch eine Substrathemmung der einzelnen MMPs erzielen (Mann et al., 1998; Dollery et al., 1995).

1.5 Artificielle Perfusionssysteme

Zur Untersuchung des Einflusses verschiedener Perfusions-, Druck- und Flussbedingungen auf venöse Bypassgefäße wurden in der Vergangenheit zahlreiche Versuchsmodelle entwickelt.

Die einfachsten Systeme umfassen hierbei eine Kultivierung von venösen Gefäßen unter statischen Bedingungen im Zell-Inkubator (Joddar et al., 2011; Porter et al., 1998; Masood et al., 1997; Soyombo et al., 1990). Die Gefäßproben wurden hierbei der Länge nach eröffnet und mit dem Lumen nach oben in Petrischalen mit Zellmedium kultiviert. Diese Systeme ermöglichen vereinfachte histologische und molekularbiologische Untersuchungen von venösen Gefäßen unter statischen Bedingungen.

Da die Aussagekraft dieser Versuche deutlich limitiert ist, erfolgte eine Weiterentwicklung dieser vereinfachten Versuchsdurchführungen unter statischen Kulturbedingungen durch einige Arbeitsgruppen, die genauere Untersuchungen zum Einfluss von Perfusions-, Druck- und Flussbedingungen auf venöse Bypassgefäße in *ex vivo* Systemen anstrebten (Ander et al., 2005; Conklin et al., 2000; Gusic et al., 2005; Paroz et al., 2004; Rey et al., 2004; Saucy et al., 2010). Insbesondere die Berücksichtigung des intakten physiologischen Gewebeverbandes innerhalb eines Gefäßes und die damit einhergehende Gewährleistung des Zell-Zell-Kontaktes in der Umgebung der extrazellulären Matrix und die Möglichkeit zum Informationsaustausch zwischen den Zellen standen hierbei im Vordergrund der Weiterentwicklung dieser Systeme. Ein weiterer zentraler und wichtiger Bestandteil dieser neuen Systeme war die Option zur Untersuchung der hämodynamischen Einflüsse auf das Gefäß. Hierdurch sollten neue Erkenntnisse der molekularbiologischen Mechanismen bezüglich der Entstehung von intimaler Hyperplasie und der damit einhergehenden Entwicklung von Bypassgraft-Stenosen dieser Gefäße nach Implantation in das arterielle Gefäßsystem gewonnen werden. Diese Ausdehnung der avisierten Versuchsbedingungen war mit einem deutlichen Mehraufwand an Gerätschaften und bei der Durchführung der Versuche verbunden. Unsere Arbeitsgruppe hat daher ein artifizielles Perfusionssystem entwickelt, das unter standardisierten und reproduzierbaren Bedingungen die Durchführung von verschiedenen hämodynamischen Perfusions-, Druck- und Flussversuchen an venösen Bypassgefäßen *ex vivo* innerhalb des physiologisch intakten Gewebeverbandes ermöglicht. Um vergleichende Untersuchungen an Gefäßproben unter verschiedenen

Perfusionsbedingungen durchzuführen, können jeweils zwei Perfusionskreisläufe parallel betrieben werden. Somit lassen sich molekularbiologische Parameter, die wesentlich an der Entstehung der Bypassgraftokklusion und am Remodeling der Gefäßgrafts beteiligt sind, untersuchen.

1.6 Fragestellung

In der vorliegenden Arbeit wurden molekularbiologische Prozesse zur Entwicklung intimaler Hyperplasie und Venengraft-Okklusion in *ex vivo* perfundierten humanen Venenbypässen untersucht.

Hierzu erfolgte die Entwicklung und Etablierung eines artifiziellen Perfusionssystems, mit dessen Hilfe standardisierte und reproduzierbare Perfusionsbedingungen geschaffen werden können.

Folgende Fragestellungen wurden dazu bearbeitet:

1. Wie lässt sich eine standardisierte Perfusion unter konstanten Versuchsbedingungen gewährleisten?
2. Wie reagieren die perfundierten Venen auf unterschiedliche Fluss- und Druckverhältnisse im zeitlichen Verlauf hinsichtlich der Vitalität *ex vivo*?
3. Welche histologischen Veränderungen zeigen die Gefäßproben unter verschiedenen Perfusionsprofilen?
4. Welche Veränderungen auf molekularer Ebene zeigen die extrazellulären Matrixproteine unter den differenten Perfusionsbedingungen im Vergleich zu einer Kontrollgruppe?

2 Material und Methoden

2.1 Technischer Aufbau des artifiziellen Perfusionssystems

In diesem Kapitel wird der Gesamtaufbau und die Funktionsweise des artifiziellen Perfusionssystems beschrieben. Mit Hilfe dieses voll funktionsfähigen Systems wurden die Zielversuche dieser Studie durchgeführt. Auf die Etablierung und die verschiedenen Phasen der Entwicklung bis hin zum Gesamtaufbau des Perfusionssystems wird im Detail im Ergebnisteil dieser Arbeit eingegangen.

Das Perfusionssystem besteht aus mehreren Teilkomponenten, von denen jede eine der benötigten Grundfunktionen realisiert um eine möglichst realitätsnahe *ex vivo* Perfusion zu ermöglichen. Um vergleichende Untersuchungen an Gefäßproben unter verschiedenen Perfusionsbedingungen durchzuführen, können jeweils zwei Perfusionskreisläufe parallel betrieben werden.

2.1.1 Teilsysteme

2.1.2 Heizung und Gehäuse

Die Aufgabe der Heizung ist die Regelung und Aufrechterhaltung einer konstanten Temperatur innerhalb der wärmeisolierten Versuchskammer. Hierbei wird Wasser über ein Wasserbad (Thermo Boy, Eurofins MWG, Ebersberg, Deutschland) erwärmt und mittels einer Pumpe dem Wärmeaustauscher zugeführt. Die gewünschte Zieltemperatur von 37°C kann über einen Regler eingestellt werden. Das Gehäuse besteht aus zwei ineinander verschachtelten Kästen. Der äußere Teil besteht aus Stahlblech und schützt vor mechanischen Einflüssen und Zugluft von außen. Der innere Teil ist die eigentliche kleinere Versuchskammer aus Styrodur, deren Wärmedämmung bei geschlossenem Deckel die über den Wärmetauscher erzeugte Temperatur mit einer maximalen Abweichung von $\pm 0,5^\circ\text{C}$ konstant hält. Die Protokollierung der Temperatur während eines Versuches erfolgt über ein digitales Thermometer, dessen Messwerte am Computer erfasst und gespeichert werden.

2.1.3 Perfusionskreislauf

Der Perfusionskreislauf beinhaltet die von einem Zylinder umgebene Gefäßhalterung mit der Gefäßprobe, das Silikonschlauchsystem mit in Reihe geschalteten Drucksensoren und die Rollerpumpe.

Die Gefäßhalterung besteht aus biokompatiblen Kunststoff (PEEK medical grade, Invibio, Deutschland) und Edelstahl (XCrNi18143). Die Gefäßprobe wird über zwei Adapter in den Zylinder eingebracht und das System mit einem Glaszylinder (Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co KG, München, Deutschland) umschlossen. Mit Hilfe von zwei Stellschrauben lassen sich die Gummidichtungen des Zylinders wasserdicht verschließen, so dass der Glaszylinder der Gefäßhalterung mit der Gefäßprobe aufliegt. Über zwei aufgesetzte mit Schraubkappen versehene Glasstutzen kann der Glaszylinder mit Nährmedium gefüllt werden. Die Gummidichtungen und Verschlusskappen gewährleisten so eine Dichtigkeit des Zylinders bei Druckwerten bis 400mmHg. An beiden Enden des Zylinders sind thermostabile biokompatible Silikonschläuche (Silikonschlauch Versilic®, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) (Innendurchmesser 4mm) befestigt, die das System mit den Drucksensoren und der Rollerpumpe verbinden. Jeweils vor und hinter dem Zylinder sind Drucksensoren (DPT-9300, Codan Critical Care, Forstinning, Deutschland) angebracht, deren Messwerte aufgezeichnet werden und über den PC eine permanente Kontrolle der Druckbedingungen im Kreislauf gewährleisten.

Der Perfusionskreislauf wird über eine Rollerpumpe (Ismatec S2, Wertheim, Deutschland) betrieben, die einen pulsartigen, nicht-statischen Fluss mit einer Frequenz zwischen 1ml/min und 160ml/min erzeugen kann.

Das Füllvolumen des gesamten Perfusionskreislaufs beträgt 12 ml.

Als Perfusionsmedium dient DMEM/Ham's F-12 (PAA, Marburg, Germany) mit 10% FCS, 2mM Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin. Für längere Versuchszeiten wird das Perfusionsmedium alle zwei Tage gewechselt, um für die Dauer des Versuches einen konstanten pH Wert zu gewährleisten.

2.1.4 Druckregelkreis

Der Druckregelkreis hat die Aufgabe, den gewünschten Zieldruck im Perfusionskreislauf einzustellen und aufrecht zu erhalten.

Hierzu ist eine Perfusorpumpe (MC Medizintechnik GmbH, Alzenau, Deutschland) über einen Dreiweghahn mit dem Perfusionskreislauf verbunden. Diese erzeugt den gewünschten Druck im Perfusionssystem. Über eine digitale Schnittstelle kann die Perfusorpumpe vom Rechner gesteuert werden. Dafür werden die Daten der Drucksensoren mit dem gewünschten Zieldruck verglichen und der Druck per Computer über die Perfusorpumpe angepasst. Der zusätzliche Einfluss der Rollerpumpe auf den Druck wird durch die Drucksensoren ebenfalls erfasst und berücksichtigt.

Über diesen Druckregelkreislauf lässt sich ein konstanter mittlerer Druck mit einer maximalen Abweichung von $\pm 2\text{mmHg}$ erzielen.

2.1.5 Kontroll-Steereinheit und Software

Die Kontroll- und Steereinheit für das artifizielle Perfusionssystem umfasst einen Computer mit Monitor. Die Benutzeroberfläche zur Einstellung und Bedienung des Systems stammt aus einem Programm das von Herrn Christian Becker in Java programmiert ist. Mittels eines PID-Reglers (Proportional-Integral-Differenziersteuerung) wird der avisierte Mitteldruck des Perfusionssystems geregelt. Die Druck- und Temperaturlaufzeichnung ist in ihrer Frequenz regelbar. Während der Versuchsdurchführung wird für den Druck alle 10 Sekunden und für die Temperatur alle 5 Minuten ein Messwert abgespeichert.

Die Benutzeroberfläche bietet die Möglichkeit, zwei Perfusionskreisläufe unabhängig voneinander zu bedienen. So lassen sich für jeden Kreislauf individuell die Flussrate der Perfusion und der Zieldruck im System einstellen. Damit können alle Parameter der Druck- und Flussteuerung zentral durch die Benutzeroberfläche eingestellt und erfasst werden.

Alle verwendeten Komponenten des artifiziellen Perfusionskreislaufs werden vor der Verwendung autoklaviert oder stellen sterile Einmalartikel dar.

2.2 Probenmaterial

Die untersuchten humanen venösen Gefäßproben wurden bei elektiven aortokoronaren Venenbypass-Operationen im Deutschen Herzzentrum München gewonnen. Die Entnahme der nichtvarikösen Venen (Vena saphena magna) erfolgte endoskopisch unter sterilen Bedingungen. Die Venengrafts wurden bis zur Implantation in autologem Patientenblut bei Raumtemperatur im Operationssaal aufbewahrt. Ein Teil des Grafts wurde direkt in Ringerlösung gegeben und auf Eis in das experimentelle Labor zur sofortigen Bearbeitung transferiert. Für die Studienversuche wurden Venengrafts von insgesamt 35 Patienten (Durchschnittsalter $73,77 \pm 6,03$ Jahre; 9 weiblich, 26 männlich) verwendet (Tabelle 12 im Anhang). Zusätzlich wurden von den Patienten der präoperative Blutdruck und der Body-Maß-Index sowie die Laborwerte von LDL, HDL, Gesamtcholesterin und Blutzucker in nüchternem Zustand protokolliert. Die Gefäßproben zur Etablierung des Systems sind nicht in die Auswertung der Studienergebnisse mit eingegangen. Die Durchführung der Studie wurde von der Ethikkommission TU München (Projekt-Nr. 1588/06) genehmigt.

2.2.1 Aufbereitung der Gefäßproben

Die weitere Aufbereitung der Proben erfolgte unter sterilen Bedingungen in einer Laminar Airflow Hood (NuAire, Plymouth, Minnesota) im experimentellen Labor. Die Gewebeproben wurden mit Ringerlösung gespült und jegliche Blutbestandteile entfernt. Ein etwa ein cm großes Stück wurde direkt als Referenzkontrolle abgeschnitten und in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Aufarbeitung bei -80°C gelagert. Für die histologische Untersuchung wurde ein weiteres Stück von 0,5 cm Länge in 4%igem gepuffertem Formalin für 24 Stunden bei 4°C fixiert. Das übrige Gewebe von etwa 3-5 cm Länge diente als Versuchsprobe für das artifizielle Perfusionssystem. Die Venenprobe wurde hierbei mit einer Spritze kanüliert und durch Perfusion mit Ringerlösung auf Dichtigkeit getestet. Eventuelle Leckagen wurden mittels Gefäßclip oder Übernaht verschlossen.

2.2.2 Einbringen der Gefäßproben in das artifizielle Perfusionssystem

Die Gefäßprobe wurde gemäß der Orientierung der Venenklappen auf die Adapter der Gefäßhalterung angebracht und mittels Nahtmaterial (Ethibond Vicryl 3-0, Ethicon GmbH, Norderstedt, Deutschland) chirurgisch fixiert. Anschließend erfolgte ein erneuter Test auf Dichtigkeit des Systems. Mit Hilfe des Stellrades der Gefäßhalterung konnten die Gefäßadapter verstellt und so auf die physiologische Länge der Probe eingestellt werden. Im nächsten Schritt wurde der Glaszylinder über die Gefäßhalterung geführt und mittels zweier Stellschrauben die Gummidichtungen flüssigkeitsdicht an das Glas adaptiert. Der Glaszylinder wurde anschließend über zwei Öffnungen mit Perfusionsmedium gefüllt und mit den Verschlusskappen abgedichtet. Hierdurch ist die Gefäßprobe von Nährmedium umgeben und luftdicht und steril gegenüber externen Einflüssen abgeschlossen. Ein Silikonschlauch wurde am vorderen und hinteren Ende des Zylinders mit einem Drucksensor verbunden. Auf der gegenüberliegenden Seite der Drucksensoren wurde dann jeweils ein Dreiwegehahn angebracht und mittels eines Silikonschlauches der Kreislauf geschlossen. Das gesamte System konnte daraufhin in das Temperaturregelungsgehäuse überführt und die freien Silikonschläuche zwischen den Drucksensoren mit der Rollerpumpe verbunden werden. Die Gefäßhalterung wurde auf dem Wärmeaustauscher platziert, um eine physiologische Temperatur von 37°C zu gewährleisten. Im nächsten Schritt wurde das komplette System entlüftet und mit Perfusionsmedium befüllt. Hierfür wurde auf dem Dreiwegehahn ein Silikonschlauch befestigt, welcher in ein steriles leeres Becherglas geleitet wurde. Auf den Einlass des dazugehörigen Drucksensors wurde nun eine Spritze mit Perfusionsmedium aufgesetzt und das Schlauchsystem hiermit entlüftet. Der Silikonschlauch über dem Dreiwegehahn wurde anschließend aus dem Becherglas genommen und mit der Spritze der Perfusorpumpe verbunden. Der artifizielle Perfusionskreislauf war damit betriebsbereit und im nächsten Schritt konnten die gewünschten Einstellungen der Versuchsbedingungen an der Benutzeroberfläche am PC vorgenommen werden.

2.3 Reagenzien und Geräte für die molekularbiologischen Untersuchungen

Die Reagenzien und Geräte für die molekularbiologischen Untersuchungen werden im Anhang aufgeführt.

2.4 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid-(MTT)-Assay

Durch das MTT-Assay kann die Vitalität und metabolische Aktivität von Zellen untersucht werden. Dabei werden die Zellen *in vitro* mit einem gelben wasserlöslichen Farbstoff (MTT) versetzt. Die vitalen Zellen können diesen Farbstoff zu wasserunlöslichem blau-violettem Formazan reduzieren. Die Umsetzung des Farbstoffs erfolgt durch mitochondriale Succinat-Dehydrogenasen der stoffwechselaktiven Zellen. Diese entspricht damit der Glykolyserate der Zellen.

Hierdurch kann ein qualitativer Nachweis der Zellvitalität und ein quantitativer der Zellzahl anhand der Reduktionsreaktion erfolgen.

MTT (Sigma, München, Deutschland) wurde als Stocklösung (5mg/ml in PBS) bei -20°C gelagert. Zur Untersuchung der perfundierten Gefäßproben auf Vitalität wurden Proben von 0,5 cm Länge in ein Eppendorf-Cup mit MTT-Lösung (1:10 Verdünnung mit serumfreiem Medium) 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde mit Ringerlösung der verbliebene Farbstoff abgespült und die Venenproben auf sterilen Kompressen getrocknet. Anhand der Qualität und Intensität der blau-violetten Formazan-Färbung wurde die Vitalität beurteilt.

2.5 Analyse auf histologischer Ebene

Für die histologische Bearbeitung der Venenproben wurden jeweils vor und nach einem Versuchsablauf im artifiziellen Perfusionssystem Gefäßproben von 0,5 cm Länge abgeschnitten und für 24 Stunden in 4%iger gepufferter Formalinlösung bei 4°C zur Gewebefixierung gelagert. Anschließend wurden die Proben in einen Einbettautomaten (Microm-Thermo Scientific, Walldorf, Deutschland) überführt und danach in Paraffinblöcke eingebettet. Mit einem Schlittenmikrotom (Microm-Thermo Scientific, Walldorf, Deutschland) wurden Schnitte von 4µm Dicke angefertigt und auf Objektträgern fixiert. Die Entparaffinierung erfolgte mittels des unten aufgeführten Protokolls (Tabelle 2).

Tabelle 2: Komponenten zur Entparaffinierung der Gefäßproben

Clear Rite 1	20 Minuten
Clear Rite 2	20 Minuten
Ethanol 1 100%	10 Minuten
Ethanol 2 100%	10 Minuten
Ethanol 1 95%	10 Minuten
Ethanol 2 95%	10 Minuten
Ethanol 70%	10 Minuten
Ethanol 35%	10 Minuten
PBS	20 Minuten
Aqua bidest.	Proben kurz spülen

Die Schnitte wurde anschließend an der Luft bis zur weiteren Hämatoxylin-Eosin-Färbung getrocknet. Bei diesem Färbeverfahren handelt es sich um zwei Einzelfärbungen zur feingeweblichen und morphologischen Darstellung. Mit der Hämatoxylin-Färbung werden saure basophile Strukturen, insbesondere DNA-haltige Zellkerne, blau eingefärbt. Dem gegenüber können mit der Eosinfärbung basische eosinophile Strukturen wie Zytoplasmaproteine dargestellt werden. In der folgenden Tabelle (Tabelle 3) sind die einzelnen Schritte dieser Färbung dargestellt. Alle Chemikalien und Reagenzien für die Histologie stammen von Sigma Aldrich Chemie, Taufkirchen, Deutschland.

Tabelle 3: Komponenten der Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Hämatoxylin nach Mayer	30 Minuten
Aqua bidest.	5 Minuten
Leitungswasser	5 Minuten
saures Ethanol (1ml HCl, 37% + 400ml 70% Ethanol)	10x kurz Eintauchen
Leitungswasser	2 x 2 Minuten
Aqua bidest	5 Minuten
- Präparate trocknen lassen-	
Eosin-B-Lösung	10 Minuten
Ethanol 1 95%	5 Minuten
Ethanol 2 95%	5 Minuten
Ethanol 1 100%	5 Minuten
Ethanol 2 100%	5 Minuten
Clear Rite 1	10 Minuten
Clear Rite 2	10 Minuten

Anschließend wurden die Gefäßschnitte getrocknet und mit Eukitt eingedeckt. Die histomorphologische Auswertung erfolgte mit einem Mikroskop Axiovert 200M und der Software AxioVision (Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland).

2.6 Untersuchung der Genexpression

2.6.1 RNA-Isolierung und Aufbereitung

Für die Untersuchung der mRNA-Expression wurde aus Venenproben die Gesamt-RNA isoliert. Hierfür wurde eine modifizierte Guanidinisothiocyanat/Phenol-Methode (Chomczynski und Sacchi, 1987) angewendet. Es wurden 100mg gefrorenes Gewebe der zu untersuchenden Venenprobe abgewogen und unter Verwendung von PeqGold-TriFast (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland) mit einem Homogenisator (Precellys 24, Peqlab Biotechnologie GmbH) homogenisiert. Im folgenden Reinigungsschritt wurden die Proben 10 Minuten bei 4°C mit 12.000 rpm zentrifugiert (Kühlzentrifuge 5810 R Eppendorf, Hamburg, Deutschland) und der klare Überstand in ein 1,5 ml Eppendorf-Cup überführt. Pro eingesetztem Milliliter

PeqGold-TriFast wurde den Proben anschließend 0,2 ml Chloroform zugegeben und 15 Sekunden gevortext. Die Ansätze wurden 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, 5 Minuten bei 4°C und 12.000 rpm zentrifugiert und in ein neues Eppendorf-Cup überführt. Um die RNA zu präzipitieren wurde den Proben pro Milliliter PeqGold-TriFast 0,5 ml Isopropanol zugegeben. Nach 10 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Ansätze 10 Minuten bei 12.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet zweimal mit 1 ml 75%igem Ethanol durch Vortexen und anschließender Zentrifugation für 10 Minuten bei 12000rpm und 4°C gewaschen.

Die RNA wurde an der Luft getrocknet und mit 50 µl RNase-freiem Wasser resuspendiert und bei -20°C gelagert.

2.6.2 DNase-Verdau der RNA

Zur Entfernung von kontaminierender genomischer DNA aus RNA-Präparationen wurde das DNA-free Kit von Peqlab (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland) verwendet.

Zu jeder RNA-Probe wurden 4,7 µl DNase-Puffer und 1µl DNase I (2 units) zugegeben, gemischt und bei 37°C für 30 Minuten inkubiert. Die Inaktivierung der DNase erfolgte durch Erhitzung der Proben auf 75°C für 10 Minuten. Anschließend wurden die Proben bei -20°C eingefroren.

2.6.3 Konzentrationsmessung der RNA

Die Konzentration der RNA wurde mit RNase-freiem aq.bidest. 1:25 verdünnt. Als Referenz diente das zur Verdünnung gebrauchte Reinstwasser. Der RNA-Gehalt der Probe wurde anhand der Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm mit einem Photometer (Biophotometer, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) bestimmt.

2.6.4 Umschreibung der RNA in cDNA

Die reverse Transkription der RNA in cDNA erfolgte mit dem Omniscript® RT Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland). Hierbei wurde für einen Gesamtansatz von 20 µl ein Mastermix mit den unten aufgeführten Komponenten erstellt.

Tabelle 4: Komponenten des Mastermix für die Umschreibung der RNA in cDNA pro Ansatz

Komponenten	Volumen
10x Buffer RT	2µl
dNTP Mix 5mM	2µl
Omniscript Reverse Transcriptase (4units/µl)	1µl
Random Hexamer Primer 250ng/µl	1µl
RNase-freies Wasser	0,25µl
Probe	13,75 µl
Gesamtvolumen	20µl

Die reverse Transkription erfolgte bei 37°C für 1 Stunde in einem Thermocycler C1000 (Biorad, München, Deutschland). Anschließend wurden die Proben auf 4°C gekühlt und entweder sofort in einer qRT-PCR getestet oder bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

2.6.5 Real-Time-quantitative Polymerase-Chain-Reaction (qRT-PCR)

Die Analyse der Expressionsrate der mRNA von MMP-2, TIMP-1, TIMP-2, TIMP-4 nach Perfusion der Venenproben im artifiziellen Perfusionssystem erfolgte durch qRT-PCR. Die Quantifizierung der amplifizierten DNA wird mithilfe einer Fluoreszenzmessung, die während jedes PCR-Zyklus erfolgt, durchgeführt. Die Fluoreszenz nimmt dabei proportional mit der Menge des PCR-Produktes zu. Die qRT-PCR wurde mit dem Light Cycler 1.5 (Roche, Mannheim, Deutschland) und dem QuantiTect SYBR-Green PCR-Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) durchgeführt. Alle Reagenzien mit Ausnahme der cDNA wurden zu einem Mastermix zusammenpipetiert.

Das Reaktionsvolumen betrug pro Ansatz 20 µl. Als Referenzgen wurde von jeder Probe humanes β -Actin amplifiziert.

qRT-PCR Ansatz:

Tabelle 5: Komponenten des Real-Time-quantitative PCR-Ansatz

Komponenten	Volumen
2x QuantiTect SYBR Green	10,0 μ l
Primer Forward 5 μ M	2,0 μ l
Primer Reverse 5 μ M	2,0 μ l
RNAse-freies Wasser	4,5 μ l
BSA 20mg/ml	0,5 μ l
cDNA	1,0 μ l
Endvolumen	20,0μl

Im Folgenden ist das Prinzip der quantitativen Real-Time-PCR dargestellt. Der Zeitpunkt der Fluoreszenzmessung ist durch die pinkfarbene Markierung dargestellt.

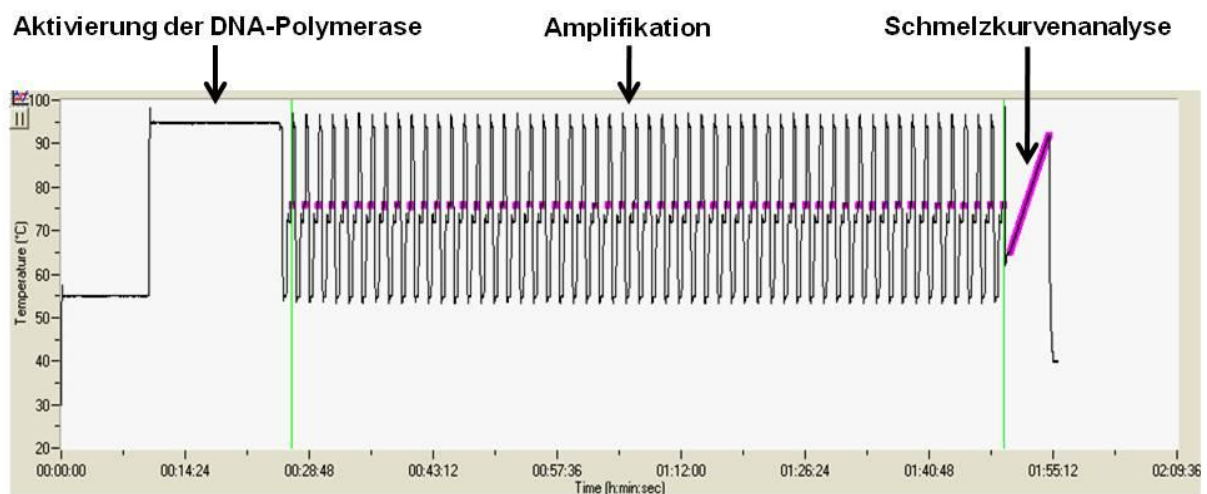


Abbildung 2: Protokoll der qRT-PCR

1. PCR (Denaturierung)
2. PCR (Annealing, Elongation)
3. Schmelzkurvenanalyse
4. Abkühlung

Zur Aktivierung der Taq-Polymerase erfolgte zunächst ein Inkubationsschritt von 15 Minuten bei 95° C. Daran schlossen sich die eigentlichen Amplifikationszyklen der PCR mit folgendem Temperaturprofil an:

Tabelle 6: Einstellungen des Light Cyclers für die qRT-PCR

Denaturierung	Annealing	Elongation	Meßtemperatur	Anzahl der Zyklen
94° C	60° C	72° C	76° C	40
15 Sekunden	20 Sekunden	20 Sekunden	5 Sekunden	

Um die Messung von Primer-Dimeren auszuschliessen, wurde die Fluoreszenz nach der Elongation bei 76°C bestimmt. Der Crossing Point (CP) wurde für jedes Transkript mittels der Fit-Points-Methode berechnet. Dabei wurde die LightCycler Software 3.5 (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Deutschland) benutzt. Der Crossing Point (CP) wird dabei als der Wert definiert, bei der das Fluoreszenzsignal signifikant größer ist als das Hintergrundsignal (Abbildung 3).

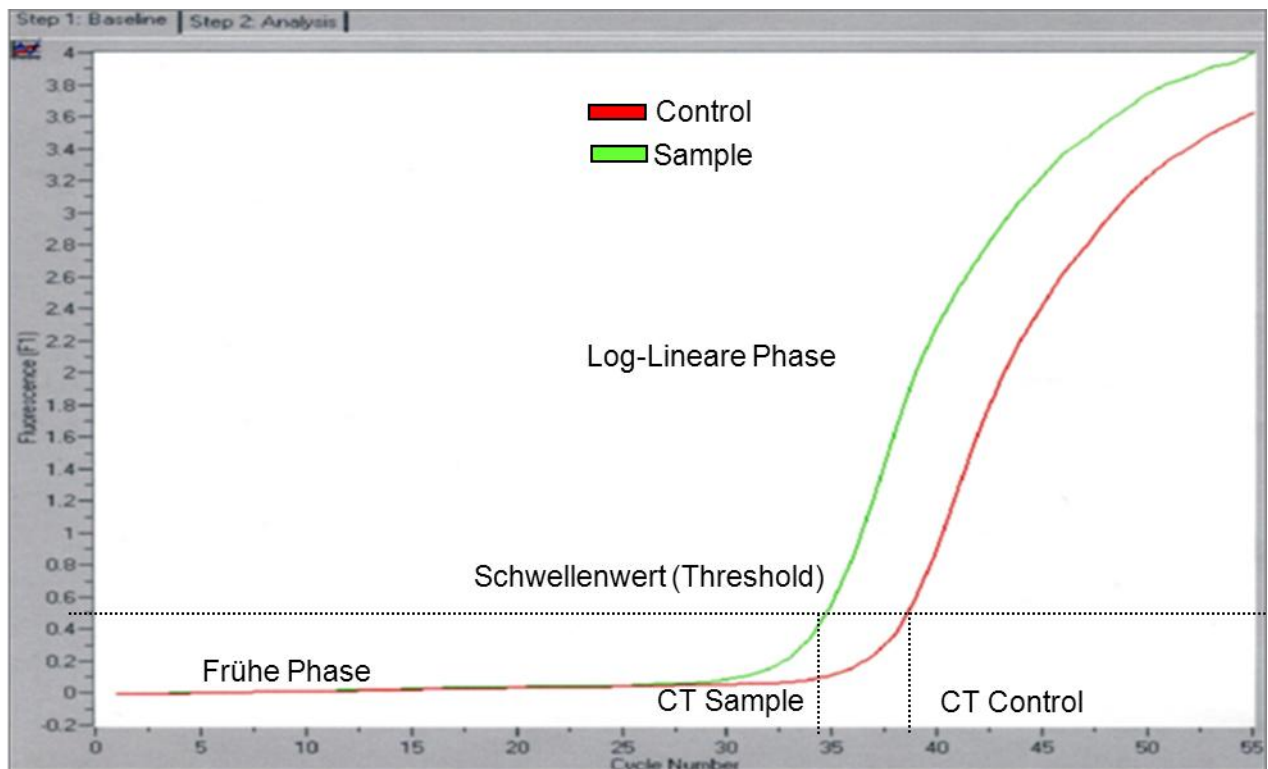


Abbildung 3: Phasen der qRT-PCR-Produktakkumulation: Darstellung der gemessenen Fluoreszenz in Abhängigkeit der Zyklenzahl; CP = Crossing Point

Zur Überprüfung der Spezifität und Integrität der Amplifikate wurde eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt (Abbildung 4). Diese Form der Analyse ist von Roche patentiert und beruht darauf, dass jedes amplifizierte Produkt eine bestimmte Schmelztemperatur und einen spezifischen Schmelzkurvenverlauf hat, die sich in dem DNA-Basen-Gehalt (GC) und der Sequenz des Amplifikats begründen. Die spezifische Schmelztemperatur wird durch das PCR-Produkt bestimmt.

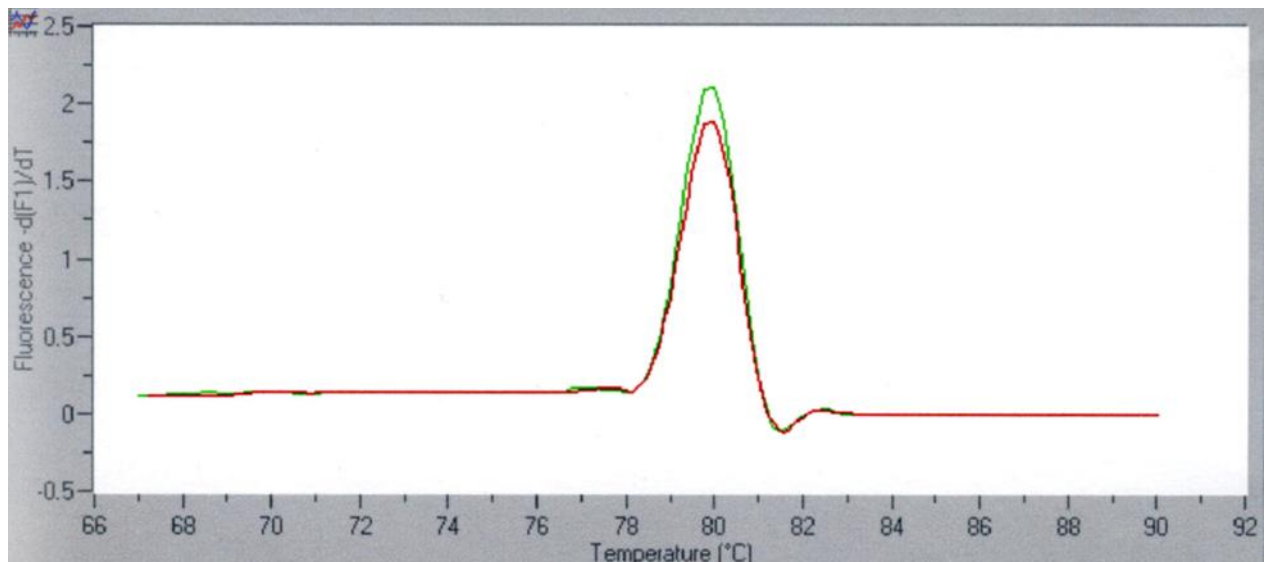


Abbildung 4: Überprüfung der Spezifität eines Produktes mit Hilfe der Schmelzkurvenanalyse.

Zusätzlich wurde zur Überprüfung der Spezifität der PCR-Produkte ein 2%iges Agarosegel angefertigt. Die Dokumentation wurde unter Zuhilfenahme der Computersoftware Quantity One® (Biorad, München, Deutschland) durchgeführt. Vor der Quantifizierung der zu untersuchenden Probe (Housekeeping-Gen β -Actin, Zielgene: MMP-2, TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3, TIMP-4) wurden Eichkurven erstellt, welche die Konzentration des jeweiligen Amplifikates über mindestens fünf Zehnerpotenzen darstellt (Abbildung 5). Die Erstellung der Eichkurven erfolgte unter den gleichen Bedingungen wie die Amplifikation der zu quantifizierenden cDNA-Proben. Als Template diente eine Probe, welche aus einem Pool der zu untersuchenden Venenproben gewonnen wurde. Alle Konzentrationen wurden in Duplikaten getestet.

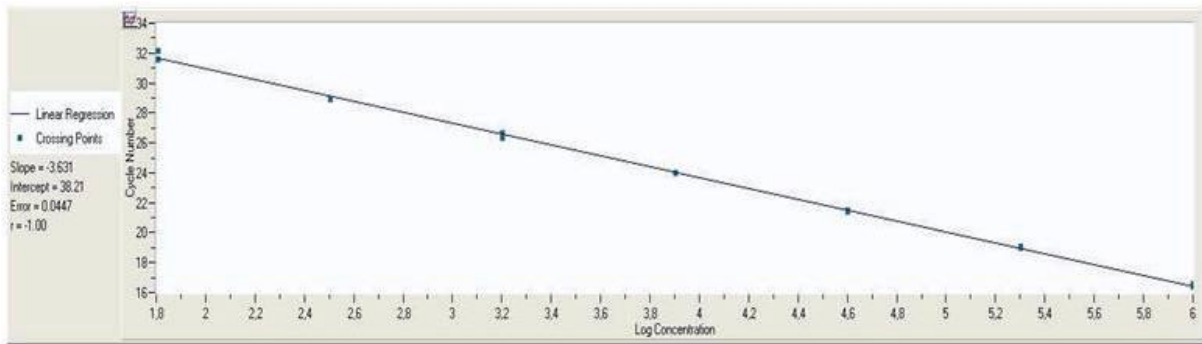


Abbildung 5: Eichkurve am Beispiel von β -Actin

Anhand dieser Eichkurven kann die relative Abundanz jedes Amplifikates in einer Probe bestimmt werden. In Abhängigkeit des CP-Wertes können jeder Probe für ein bestimmtes Amplifikat sog. „arbitrary units“ (AU) zugewiesen werden. Durch die Bildung des Quotienten AU Gene of interest (z.B. MMP-2) / AU β -Actin kann die relative Abundanz der Expression eines bestimmten Gens zwischen unabhängigen Proben verglichen werden.

2.7 Analyse auf Proteinebene

2.7.1 Zymographie

Die Zymographie ist eine Methode zur Darstellung der proteolytischen Gelatinase-Aktivität der Matrixmetalloproteinasen im Probenisolat, welche elektrophoretisch auf einem Polyacrylamid-Gel aufgetrennt werden. Dem Gel wird zusätzlich ein Substrat der zu untersuchenden Proteine zugegeben (in diesem Fall Gelatine). Für die Größenbestimmung der einzelnen MMP-Formen wurde ein Marker als Längenstandard für Gelatinasen verwendet (Chemicon International, Temecula, CA).

2.7.2 Proteinisolierung

Die bei -80°C gelagerten Venenproben wurden im gefrorenen Zustand zerteilt und jeweils 100mg abgewogen (Mikrowaage, Sartorius, Göttingen, Deutschland). Anschließend wurde 1 ml Proteinisolierungspuffer nach Li et. Al. (Tabelle 7) zu den Proben gegeben und diese im Homogenisator (Precellys 24, Peqlab Biotechnologie GmbH) für 2x 1,5 Minuten homogenisiert. Nach 10-minütiger Zentrifugation bei 12.000 rpm und 4°C wurde der Proteinüberstand abgenommen und in ein neues

Eppendorf-Cup überführt. Die Proteinextrakte verblieben bei -80°C bis zur weiteren Verwendung.

Tabelle 7: Komponenten des Proteinisolationspuffers nach Li et. Al

Komponenten	Endkonzentration
Cacodyl-Säure, pH 5,0	10 mM (138mg/100ml H ₂ O)
NaCl	150 mM (876,6mg/100ml H ₂ O)
ZnCl ₂	1µm (13,828mg/100ml H ₂ O)
NaN ₃	1,5 mM (9,75mg/100ml H ₂ O)
Triton X-100	0,01% (10µl/100ml H ₂ O)
CaCl ₂	20 mM (294mg/100ml H ₂ O)

2.7.3 Proteinkonzentrationsbestimmung mit der Bicinchoninsäure-Reaktion

Die Proteinkonzentrationsbestimmung erfolgte mittels der BCA-Methode, bei der es sich um eine quantitative photometrische Bestimmung der Proteinmenge handelt. Hierbei reagieren zweiwertige Kupferionen quantitativ mit Proteinen zu einwertigen Kupferionen. Diese bilden mit der Bicinchoninsäure einen violetten Farbstoff, dessen Absorption bei einer Wellenlänge von 562nm photometrisch bestimmt werden kann. Als Standard wurde eine Eichkurve für BSA erstellt, wodurch die Proteinkonzentration über den gemessenen OD-Wert der Probe bestimmt werden konnte. Die Messungen wurden im Photometer (Biophotometer, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) durchgeführt.

2.7.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) für die Zymographie

Die Auftrennung der Proteine erfolgte elektrophoretisch mit einer konventionellen SDS-PAGE nach der Methode von Laemmli (Laemmli, 1970). Die Gele enthielten Gelatine in einer Konzentration von 1mg/ml und 10% SDS Polyacrylamid. Alle für die SDS-PAGE verwendeten Gerätschaften stammen von Biorad, München, Deutschland. Die notwendigen Chemikalien und Reagenzien wurden von Sigma Aldrich Chemie, Taufkirchen, Deutschland, bezogen.

Es wurden 10%ige Trenn- und 4%ige Sammelgele verwendet (Tabelle 8). Dazu wurde zunächst die Gelkassette für das zu gießende Gel (Größe 7 x 9 cm, Dicke 0,75 mm), bestehend aus einer Spacerplatte (8,3 x 10,1cm; Vertiefung 0,75mm) und einer dünneren Deckplatte (7,3 x 10,1 cm), zusammengesetzt und in den Gießstand eingepasst. Anschließend wurden die Komponenten des Trenngels zusammenpipettiert und zum Schluss Ammoniumpersulfat (APS) und TEMED (Tetramethylethylenediamin) zur Polymerisierung des Gels zugegeben. Die Trenngellösung wurde in die vorbereitete Gelkassette gegeben und mit aqua bidest. überschichtet. Die Polymerisation erfolgte innerhalb von 45-60 Minuten. Anschließend wurde die wässrige Phase abgegossen und das Sammelgel analog zum Trenngel hergestellt. Die Sammelgellösung wurde auf das Trenngel pipettiert und ein Kamm (5 wells; Dicke 0,75mm) für die Slots zwischen die Glasplatten eingesetzt. Nach 30 Minuten war das Gel ausgehärtet. Der Kamm wurde entfernt und die Slots mit Laufpuffer ausgespült.

Tabelle 8: Komponenten der Sammel- und Trenngele für die Zymographie

Zymographie Trenngel (10%)	Zymographie Sammelgel (4%)
3,13 ml aq.bidest.	5,02 ml aq.bidest.
3,3 ml 30% (w/v) Acrylamid-Bis-Lösung	1,33 ml 30% (w/v) Acrylamid-Bis-Lösung
2,5 ml Trenngelpuffer 1.5 M Tris pH 8.8	2,5 ml Sammelgelpuffer 0.5 M Tris pH 6.7
35 µl 10% (w/v) Ammoniumpersulfat (Sigma)	120 µl 10% (w/v) Ammoniumpersulfat (Sigma)
3,75 µl Tetramethylethylenediamine (Sigma)	26 µl Tetramethylethylenediamine (Sigma)
1 ml 10x Gelatine (porcine-SKIN; Sigma)	1 ml 10x Gelatine (porcine-SKIN; Sigma)
2,15 ml Sucrose-Lösung	2,15 ml Sucrose-Lösung
10 µl 10% (w/v) Sodium dodecylsulfate, SDS	10 µl 10% (w/v) Sodium dodecylsulfate, SDS

Für die anschließende Elektrophorese wurde die Elektrophoresekammer mit zwei Gelkassetten bestückt und mit 1:10 verdünntem Zymographie-Laufpuffer (Tabelle 9) befüllt. Pro Spur wurden 30 µg Protein eingesetzt. Die Proteinproben wurden jeweils mit der doppelten Menge an Zymographie-Sample-Puffer verdünnt und auf das Gel aufgetragen.

Die anschließende Elektrophorese erfolgte bei 150V für 150 Minuten mit dem MiniProtean-3-Elektrophorese-System.

Tabelle 9: Komponenten des Zymographie-Laufpuffers und Sample-Puffers

Zymographie-Laufpuffer (10x)	Zymographie-Sample-Puffer (2x)
15 g Tris Base	2,15 ml Aqua bidest
72 g Glycin	1,25 ml 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8
5 g SDS	2,5 ml Glycerin
ad 500 ml Aqua bidest	4 ml 10% SDS
	0,1 ml 1% Bromphenolblau

2.7.5 Aktivitätsnachweis der Proteine

Das Gel wurde nach zwei 15minütigen Waschsritten mit 100 ml Renaturierungspuffer für 24 Stunden in 100 ml Entwicklungspuffer bei 37°C inkubiert, um einen ausreichend hohen Gelatineabbau durch die Matrixmetalloproteinasen zu gewährleisten. Die Reagenzien des Renaturierungs- und Entwicklungspuffers wurden in Stocklösungen mit einem Gesamtvolumen von 1 Liter hergestellt und bei 4°C gelagert.

Tabelle 10: Komponenten des Zymographie-Renaturierungspuffers und des Entwicklungspuffers

Renaturierungspuffer	Entwicklungspuffer
25 ml Triton X-100	6,06 g Tris Base
975 ml Aqua bidest	11,7 g NaCl
	0,56 g CaC ₂ l
	670 µl 30% Brij-35
	Ad 1000 ml mit Aqua bidest

Durch die Färbung mit 100 ml Coomassie-Blau für drei Stunden und der anschließenden Entfärbung mit 100 ml Methanol/Essigsäure für 30-60 Minuten wurden die Gelatineabbau-Banden sichtbar.

Tabelle 11: Komponenten der Coomassie-Färbelösung und der Entfärbelösung

Coomassie-Färbelösung	Entfärbelösung
400 ml Methanol	400 ml Methanol
100 ml Essigsäure	100 ml Essigsäure
5 g Coomassie-brilliant-blue R250	500 ml Aqua bidest
500 ml Aqua bidest	

Die Banden für pro-MMP-2 und MMP-2 wurden anhand ihres Molekulargewichts identifiziert. Die Bestimmung ihrer Intensität und die quantitative Auswertung erfolgte mithilfe der Software ImageJ (Version 1.43u, National Institute of Health, USA).

2.8 Statistische Analyse

Die statistische Auswertung der Ergebnisse der Genexpressionsanalysen und der Proteinanalysen erfolgte mit dem Student's T-test. Unterschiede in der Vitalität der Gefäßproben beim MTT-Assay wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test berechnet. Unterschiede in den Ergebnissen wurden als signifikant bei Werten von $p < 0,05$ angenommen.

3 Ergebnisse

3.1 Vorversuche Artifizielles Perfusionsmodell

Bevor Untersuchungen zu Änderungen molekularbiologischer Parameter als Konsequenz definierter Druckprofile möglich waren, musste der artifizielle Kreislauf in Vorversuchen etabliert und an verschiedenen Punkten angepasst und optimiert werden. Erst das aus diesen Pilotversuchen resultierende voll funktionsfähige und standardisierte Perfusionsmodell wurde für die Quantifizierung der Gen- und Proteinexpression herangezogen.

3.1.1 Entwicklung und Optimierung des artifiziiellen Perfusionssystems

Bei den Pilotversuchen stand die Entwicklung und Etablierung eines artifiziiellen Perfusionssystems im Fokus, welches standardisierte und reproduzierbare Ergebnisse unter konstanten Versuchsbedingungen ermöglicht. Hierfür war eine fortlaufende Optimierung und Weiterentwicklung des Systems anhand der in den Versuchen aufgetretenen Probleme notwendig.

In Abbildung 6 ist der erste rudimentäre Perfusionskreislauf dargestellt, mit dessen Hilfe die ersten Perfusionsversuche an humanen venösen Gefäßproben durchgeführt wurden.



Rudimentärer Perfusionskreislauf mit Gefäßhalterung und perfundierter Vene

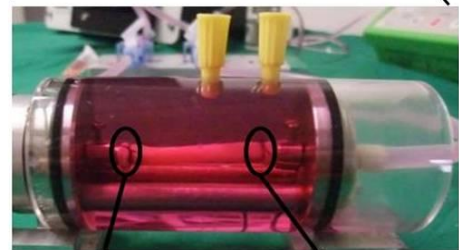


Abbildung 6: Rudimentärer Perfusionskreislauf mit Gefäßhalterung und perfundierter Vene

Dieser Perfusionskreislauf bestand aus einer einfachen Gefäßhalterung aus Metall umgeben von einem Plastikzylinder, einer Rollerpumpe, zwei Drucksensoren und dem Schlauchsystem. Die Gefäßproben wurden mittels Anhaft auf den Metalladaptern der Gefäßhalterung fixiert. Über zwei Öffnungen im Plastikzylinder wurde die Gefäßhalterung mit der zu perfundierenden Vene mit Medium befüllt und mit zwei Plastikstutzen abgedichtet. Anschließend wurde das Schlauchsystem entlüftet und mit Perfusionsmedium gefüllt. Der Perfusionsdruck im System wurde durch die Regulierung der Flussrate über die Rollerpumpe erzeugt. Somit war zunächst nur eine Einstellung des gewünschten Druckes in Abhängigkeit von der

Flussrate möglich. Die Einstellung der Flussrate über die Rollerpumpe erfolgte manuell. Die Daten der Drucksensoren und der Druckkurve wurden mit der Software LabView (National Instruments Deutschland GmbH, München) erfasst (Abbildung 7).

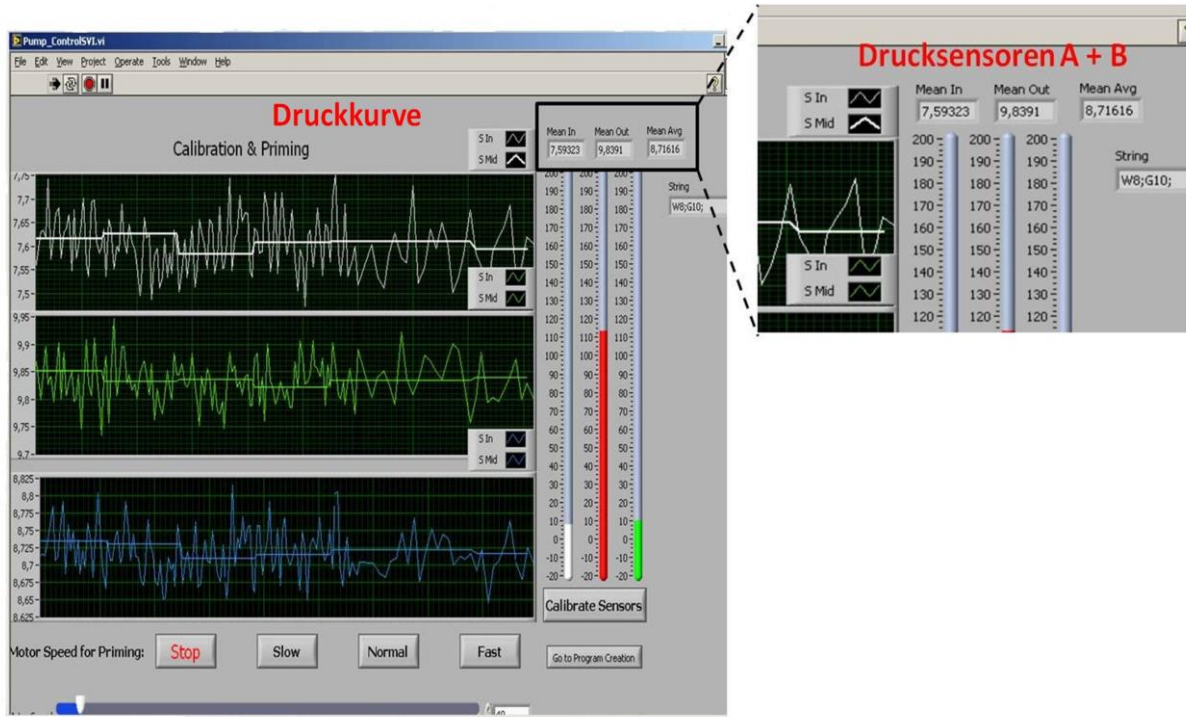


Abbildung 7: Datenaufzeichnung des rudimentären Perfusionskreislaufs

Durch die Undichtigkeit des Perfusionssystems insbesondere an Prädilektionsstellen wie den Gummidichtungen und den Einfüllöffnungen der Gefäßhalterung kam es zu einem permanenten Druckabfall und durch die Verwendung von nicht-sterilisierten Materialien zur Kontamination durch Keime in das System.

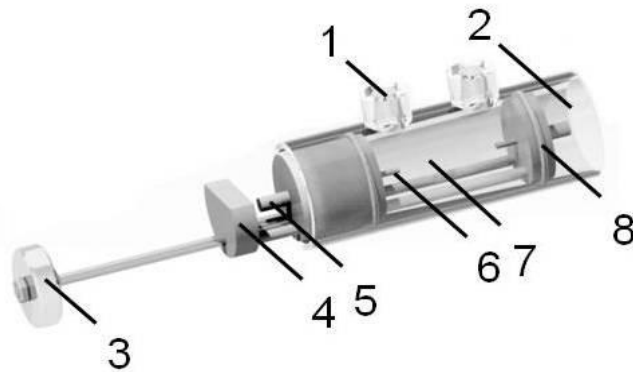
Desweiteren führte eine längere Perfusion insbesondere bei höheren Druckwerten dazu, dass sich die venöse Gefäßprobe von den Metalladaptern der Gefäßhalterung löste und der Perfusionskreislauf hierdurch unterbrochen wurde. Aufgrund der Druckeinstellung über die manuelle Regulation in Abhängigkeit von der Flussrate war eine genaue Einstellung des gewünschten Zieldrucks sehr schwierig. Da viele dieser oben aufgeführten Probleme häufig unbemerkt während eines laufenden Versuches auftraten und die Daten der Drucksensoren nicht zentral über einen Computer erfasst und gespeichert wurden, konnten keine eindeutigen Aussagen über den zeitlichen

Verlauf und das Auftreten von Komplikationen während eines Versuches gemacht werden.

Anhand dieser Vorversuche ergaben sich bei der Perfusion von humanen Gefäßproben folgende grundlegenden Probleme mit dem ersten Kreislaufsystem.

- Druckabfall
- Dichtigkeit
- Sterilität
- Befestigung der Gefäßproben
- Zentrale Erfassung und Speicherung der Versuchsdaten

Die größte Schwierigkeit bestand vor allem darin, die Dichtigkeit der einzelnen Komponenten des Perfusionssystems zu gewährleisten und den damit einhergehenden Druckabfall sowie eine Kontamination des Systems durch Keime von außen zu verhindern. Diese Hauptproblematik konnte durch mehrere Modifikationen des Kreislaufs gelöst werden. Anstelle der zunächst starren Gefäßhalterung aus Metall mit zwei einfachen Gummidichtungen erfolgte eine Weiterentwicklung zu einem flexiblen System mit adaptierbaren Dichtungen mittels Stellschrauben. Desweiteren wurden statt der Plastikzylinder, die durch wiederholtes Autoklavieren ihre Form änderten und porös wurden, eigens hierfür manuell produzierte Glaszylinder mit zwei Glasstutzen und Schraubkappen benutzt. Somit konnte durch die Verwendung von thermostabilen Materialien und einer optimalen Adaptation der Gummidichtungen an den Glaszylinder eine Leckage verhindert werden. Ebenso gewährleistete das geschlossene System einen Schutz vor dem Eindringen von Keimen (Abbildung 8).



- 1: ports for medium exchange
- 2: glass tubing
- 3: rotating wheel for length adjustment of sliding unit
- 4: sliding unit
- 5: Luer connector to circuit
- 6: tapered adapter to fix veins
- 7: vessel chamber
- 8: sealing ring

Abbildung 8: Komponenten der Gefäßhalterung

Durch das Einbringen von kegelförmigen Metalladaptern mit eingefrästen Riefen in die Gefäßhalterung konnte fortan ein Abrutschen der Gefäßprobe und somit eine Unterbrechung des Perfusionskreislaufs vermieden werden. Trotz diesen deutlichen Verbesserungen des Systems war weiterhin ein permanenter Druckabfall im Versuchsablauf zu beobachten, auch wenn keine offensichtliche Leckage vorhanden war. Dieser Druckverlust beruht wahrscheinlich auf einer kontinuierlichen, wenn auch geringen, Diffusion der Perfusionsflüssigkeit über das Schlauchsystem. Dieses Problem konnte durch den Einsatz einer Perfusionspumpe gelöst werden, die aus einem Flüssigkeitsreservoir bei Druckabfall über einen Dreiwegehahn eine geringe Menge Medium in den Kreislauf einspeiste (Abbildung 9).

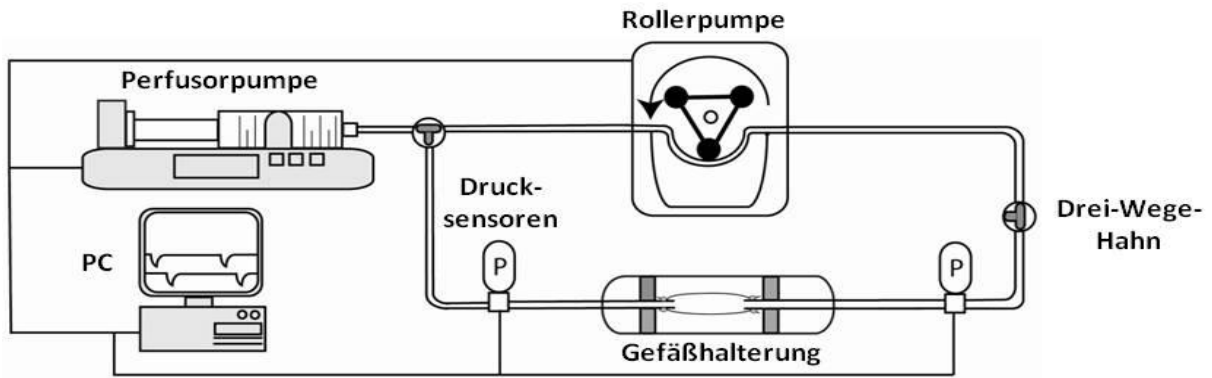


Abbildung 9: Schematischer Aufbau des artifizierten Perfusionssystems

Damit ein stabiler Druck konstant aufrechterhalten wurde war es notwendig, die Daten der Drucksensoren dauerhaft aufzuzeichnen. Anhand der Daten der Drucksensoren, welche mit dem gewünschten Zieldruck verglichen wurden, konnte der Druck per Computer über die Perfusorpumpe entsprechend angepasst und ein konstanter Mitteldruck mit einer maximalen Abweichung von $\pm 2\text{mmHg}$ gewährleistet werden.

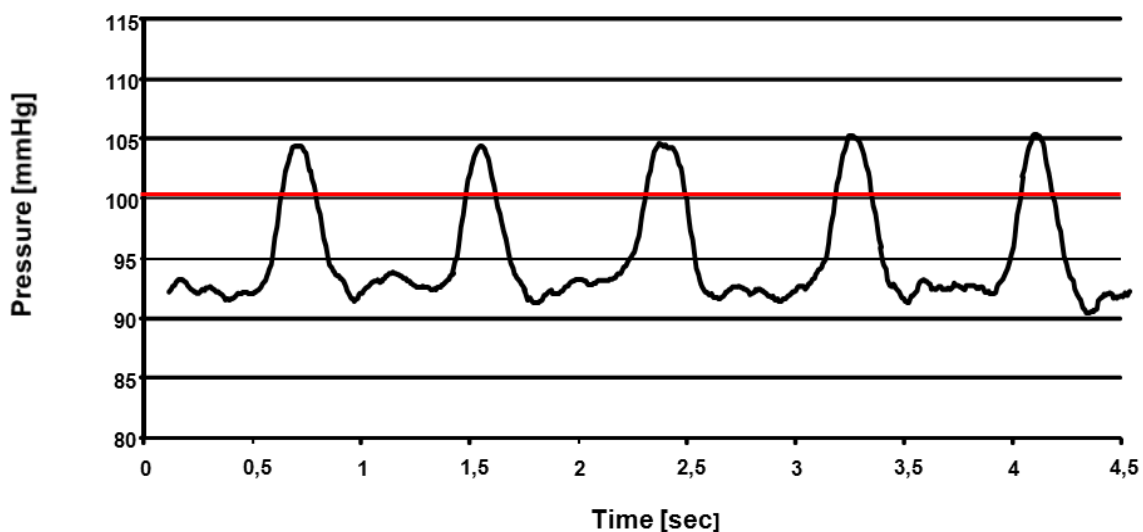


Abbildung 10: Profil der arteriellen Druckkurve bei einem Mitteldruck von 100mmHg

Eine stetige Weiterentwicklung der Betriebssoftware ermöglichte die Einstellung aller gewünschten Versuchsbedingungen über eine graphische Benutzeroberfläche. Somit konnten die anfänglich manuell vorgenommenen Einstellungen der einzelnen

Geräte des Systems, wie z.B. die Regulierung der Pumpgeschwindigkeit der Rollerpumpe, zentral am PC getätigt und alle Daten zusammen erfasst und gespeichert werden (Abbildung 11).

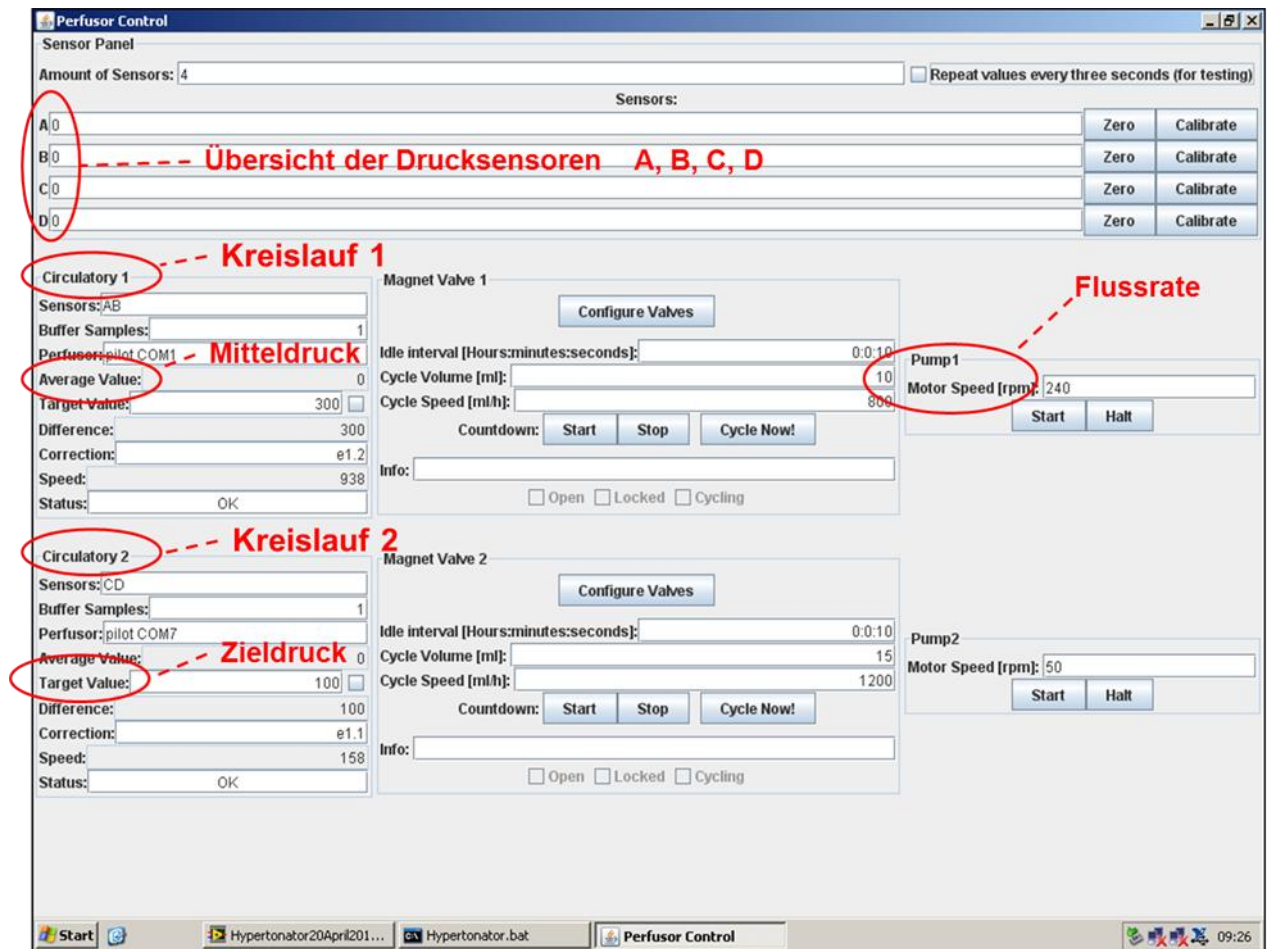


Abbildung 11: Benutzeroberfläche der Einstellungsmaske

Durch diese Verbesserungen des Systems wurde sichergestellt, dass keine Teilkomponente des Kreislaufes unbemerkt fehlerhaft arbeiten konnte, da zu jedem Versuchsablauf am PC die Daten von Temperatur, Druck und Flussgeschwindigkeit über die Zeit des Experimentes permanent aufgezeichnet wurden.

Um vergleichende Untersuchungen an Gefäßproben unter verschiedenen Perfusionsbedingungen durchführen zu können, wurden zwei gleichartige Perfusionskreisläufe entwickelt (Abbildung 12).

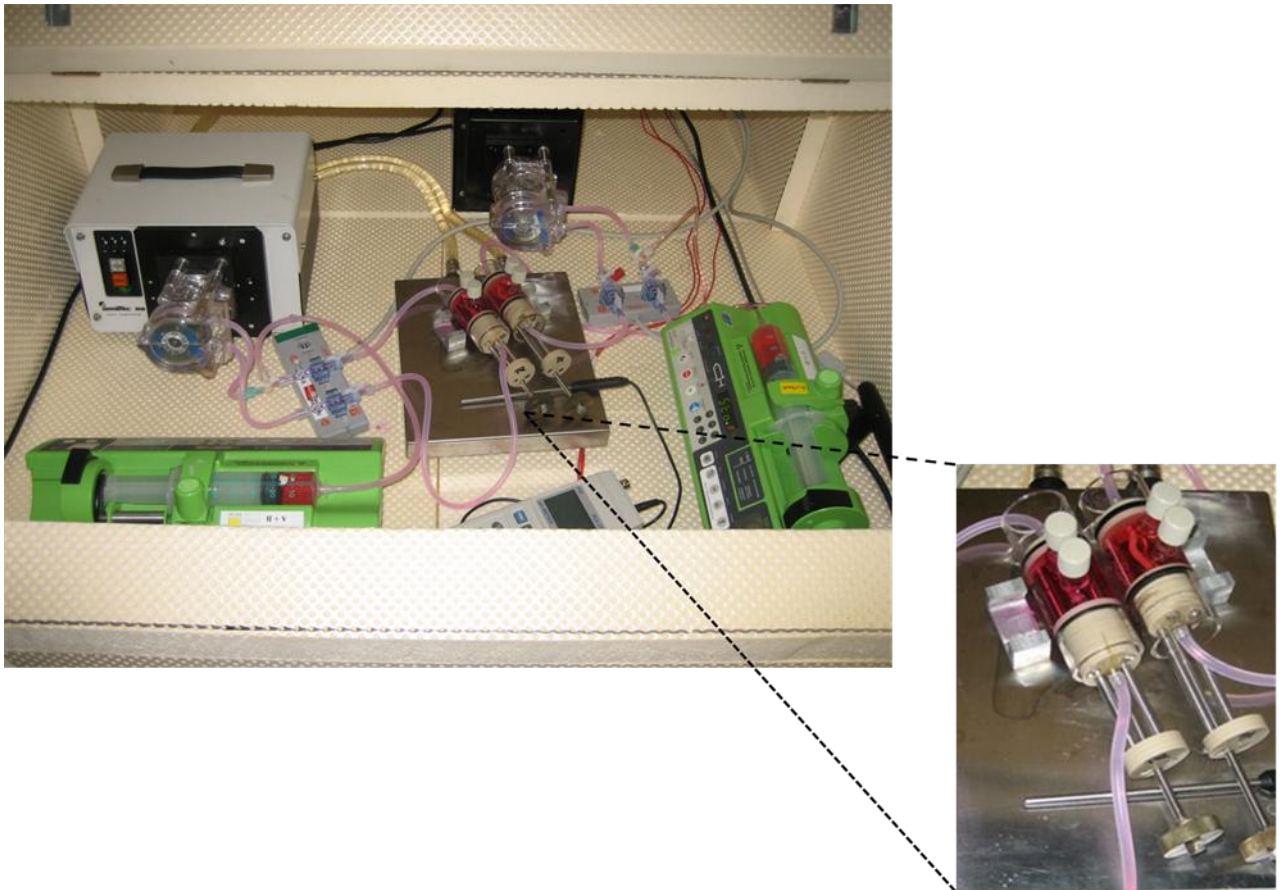


Abbildung 12: Zwei parallel betriebene künstliche Perfusionskreisläufe

In der Phase der Vorversuche wurden die Experimente zunächst ohne Temperaturregelung bei Raumtemperatur durchgeführt. Durch den Einbau einer regelbaren Heizung mit Wärmeaustauscher und die Überführung des künstlichen Perfusionssystems in eine isolierte Wärmekammer aus Styrodur konnten alle nachfolgenden Versuche unter konstanten Temperaturbedingungen von 37°C durchgeführt werden. In Abbildung 13 ist der Gesamtaufbau des künstlichen Perfusionssystems dargestellt. Mit Hilfe dieses Systems erfolgte die Durchführung der Studienversuche.

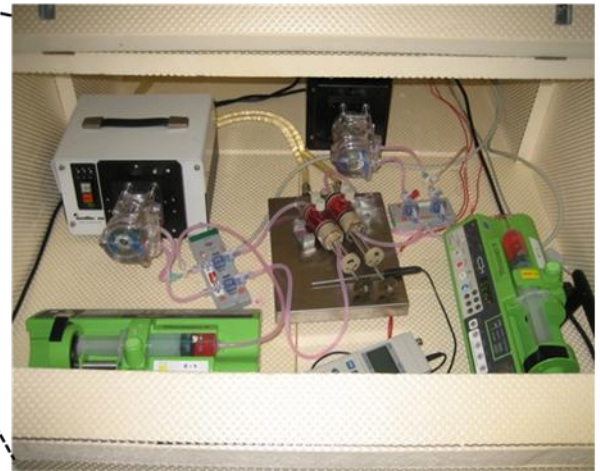
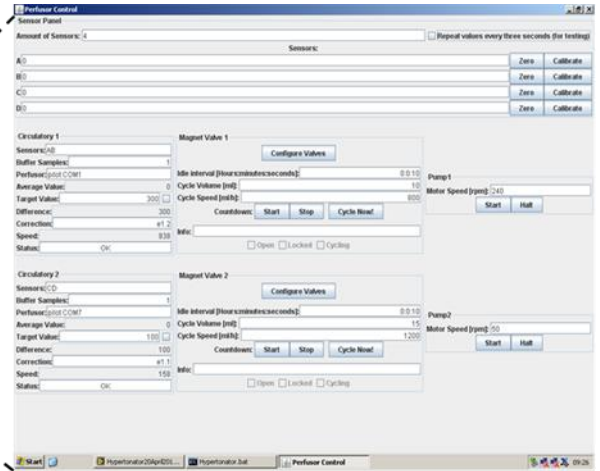


Abbildung 13: Kompletter Aufbau des Systems

3.1.2 Einfluss verschiedener Flussprofile auf die Überlebensfähigkeit humaner Venenproben

Nach der technischen Etablierung des Perfusionssystems zur Durchführung von Versuchen unter konstanten und reproduzierbaren Bedingungen sollte zunächst untersucht werden, wie lange die Gefäßproben bei unterschiedlichen Fluss- und Druckbedingungen *ex vivo* lebensfähig blieben. Hierfür wurden zunächst Venenproben (n=12) zur Untersuchung des Druckeinflusses 24 Stunden mit 10 mmHg (physiologisch), 100 mmHg (arteriell) oder 200 mmHg (pathologisch) perfundiert. Gleiches wurde für die Zeitdauer untersucht, in dem Gefäßproben (n=11) unter konstanten Druckbedingungen unterschiedlich lange (1-14 Tage) perfundiert wurden. Dabei zeigte sich im MTT-Assay, welcher stoffwechselaktive und damit vitale Zellen nachweist, dass die Gefäßproben bei sehr hohen Druckwerten (>180mmHg) bereits nach 24 Stunden keine Stoffwechselaktivität mehr zeigten (Daten nicht gezeigt), wohingegen bei niedrigeren Druckwerten (10mmHg) eine Perfusion von vitalen Proben bis zu 14 Tagen gegeben war (Abbildung 14).



Abbildung 14: Morphologische Darstellung des MTT-Assays an repräsentativen Beispielen nach Perfusion mit 10mmHg

Ein ähnliches Bild ergab die Perfusion von Proben (n=9) mit unterschiedlichen Flussraten bei konstanten Druckbedingungen über die Zeit. Auch hier kam es bei einer hohen Flussrate (100ml/min) nach etwa sieben bis zehn Tagen zum Absterben der Gefäßproben, im Gegensatz zu Proben, die unter niedrigerer Flussrate (5ml/min) ebenfalls bis zu 14 Tage Vitalität aufwiesen (Abbildung 15).

Überlebenszeit der Gefäßproben in Abhängigkeit der Flussrate (Tage)															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Flussrate 5ml/min (n=4)	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	3	3	1	0
Flussrate 100ml/min (n=5)	5	5	5	5	5	4	4	2	2	1	0	0	0	0	0

Abbildung 15: Graphische Darstellung der Vitalität der Gefäßproben in Abhängigkeit von der Flussrate. Grün: Venengewebe vital, rot: Venengewebe abgestorben.

Anhand dieser Ergebnisse aus den Vorversuchen wurden für die histologischen und molekularen Untersuchungen zwei Gruppen von Gefäßproben verglichen:

- Perfusion mit venösem, physiologischem Druckprofil
- Perfusion mit arteriellem Druckprofil (Bypass-Bedingungen)

Dadurch ergibt sich die Möglichkeit, den Einfluss der arteriellen Perfusionsbedingungen auf einen venösen Bypass graft *in vivo* mit dem neu entwickelten und standardisierten Perfusionssystem *ex vivo* nachzuempfinden und direkt mit der venösen physiologischen Situation vergleichen zu können.

3.1.3 MTT-Assay zur Vitalitätsmessung der Gruppen A (venöse Perfusion) und B (arterielle Perfusion)

Anhand der Vorversuche liess sich die Überlebensfähigkeit in Abhängigkeit von den Perfusionsbedingungen bereits abschätzen. Selbstverständlich wurde aber die Vitalität für die Gruppen A und B nochmals unabhängig validiert. Die Gefäßproben mussten nach Beendigung der Perfusion noch volle Vitalität für die anschließende molekularbiologische Aufarbeitung der Proben aufweisen. Daher wurde mittels eines MTT-Assays die Überlebenszeit an unabhängigen Proben für Gruppe A (n=6) und Gruppe B (n=6) ermittelt (Abbildung 16).

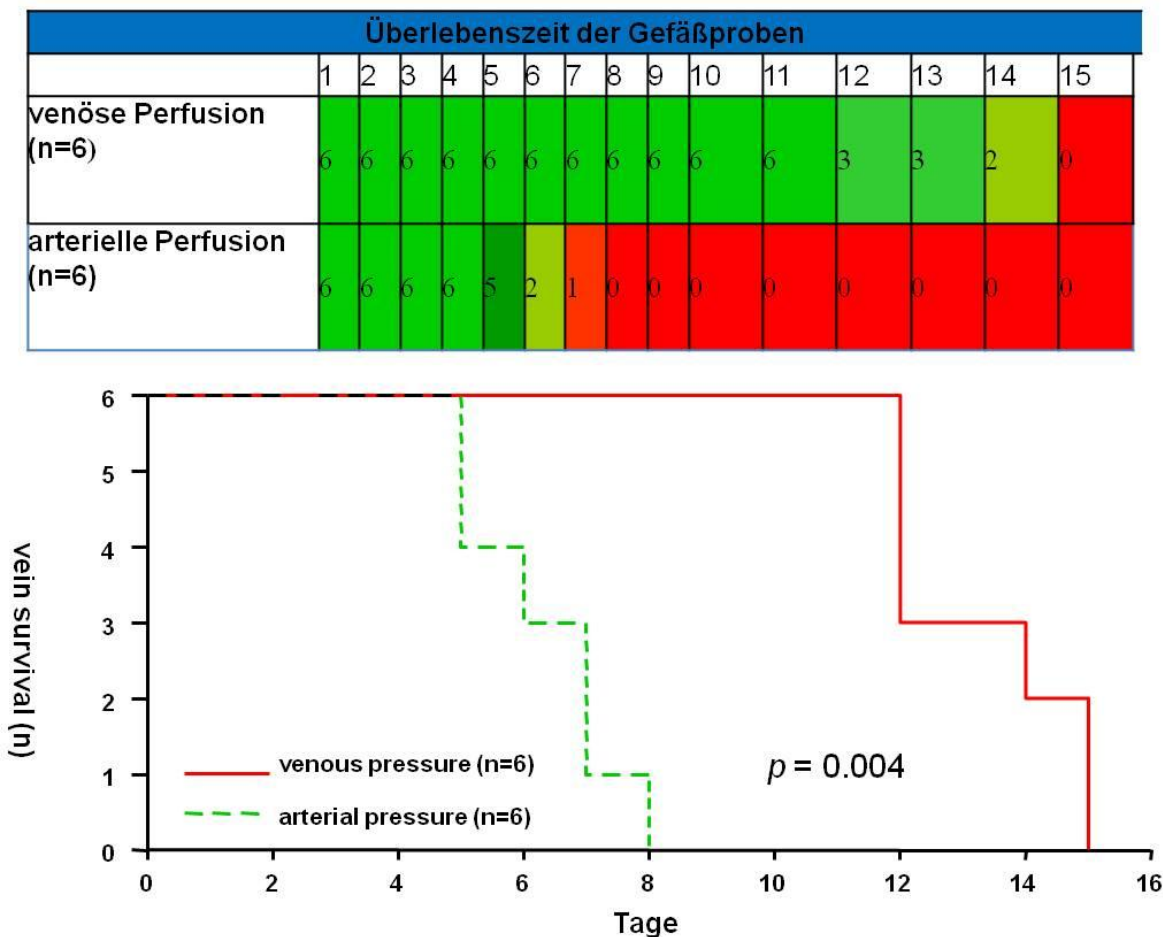


Abbildung 16: Graphische Darstellung der Vitalität des MTT-Assays der Gruppen A und B

MTT-Assay zur Messung stoffwechselaktiver Zellen und ihrer Überlebensfähigkeit

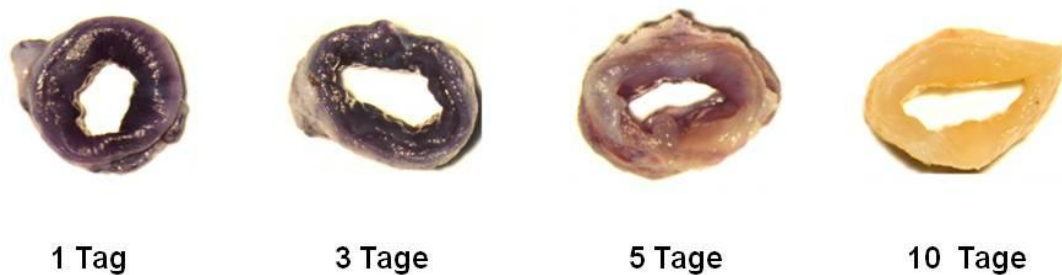


Abbildung 17: Morphologische Darstellung des MTT-Assays an einem repräsentativen Beispiel nach arterieller Perfusion

Diese Vitalitätsmessung bestätigte die Ergebnisse aus den Vorversuchen. So blieben die Gefäßproben unter physiologischer venöser Perfusion (Gruppe A) bis zu 12 Tagen voll lebensfähig, danach nahm die Überlebensfähigkeit stetig ab. Unter arteriellen Versuchsbedingungen (Gruppe B) konnte eine vollständige Vitalität der Gefäßproben bis zu 5 Tagen aufrecht erhalten werden. Nach dieser Perfusionsdauer nahm die Vitalität der Gefäße ab.

Somit ergab sich, dass für eine molekularbiologische Aufarbeitung der Proben jeweils die Tage 1-5 der Gruppen A und B in die Auswertung einfließen konnten. Die Analyse dieser Parameter erfolgte deshalb nach einer Perfusion der Gefäße von ein, drei oder fünf Tagen.

In Abbildung 18 sind die Parameter der Perfusionsbedingungen für beide Gruppen dargestellt.

	Gruppe A = venös	Gruppe B = arteriell
Perfusionsdauer (Tage)	1, 3, 5	1, 3, 5
Perfusionsdruck (mmHg)	10	100
Flussrate (ml/min)	5	50

Abbildung 18: Perfusionsprofil der Gruppe A und B

3.2 Ergebnisse der Histologie

Zur weiteren Untersuchung und Darstellung potentiell pathologischer Um- oder Abbauprozesse der Venenproben, ausgelöst durch die Perfusion mit verschiedenen Druckprofilen, wurden histologische Schnitte von den Gefäßproben angefertigt. Als Kontrolle diente hierbei ein nicht-perfundiertes Stück der gleichen Venenprobe.

Hierbei zeigte sich, dass unter venösen Perfusionsbedingungen nach Perfusion von ein und drei Tagen keine offensichtlichen histologischen Veränderungen des Gefäßes zum Kontrollstück ersichtlich waren. Lediglich nach fünf Tagen konnte eine geringgradige Verdickung der Gefäßintima beobachtet werden (Abbildung 19).

Im Vergleich zur venösen Perfusion konnte unter arteriellen Versuchsbedingungen nach einem Tag ebenfalls kein histomorphologischer Unterschied festgestellt werden. Demgegenüber zeigte sich bereits nach drei Tagen Perfusion eine sichtbare Zunahme der Gefäßintima und nach fünf Tagen arterieller Perfusion waren deutliche hyperproliferative Bereiche mit intimaler Hyperplasie darstellbar (Abbildung 20). In den folgenden Graphiken wird der histomorphologische Zustand der Gefäße nach venöser und arterieller Perfusion im Vergleich zu einem unbehandelten Kontrollgefäßes dargestellt.

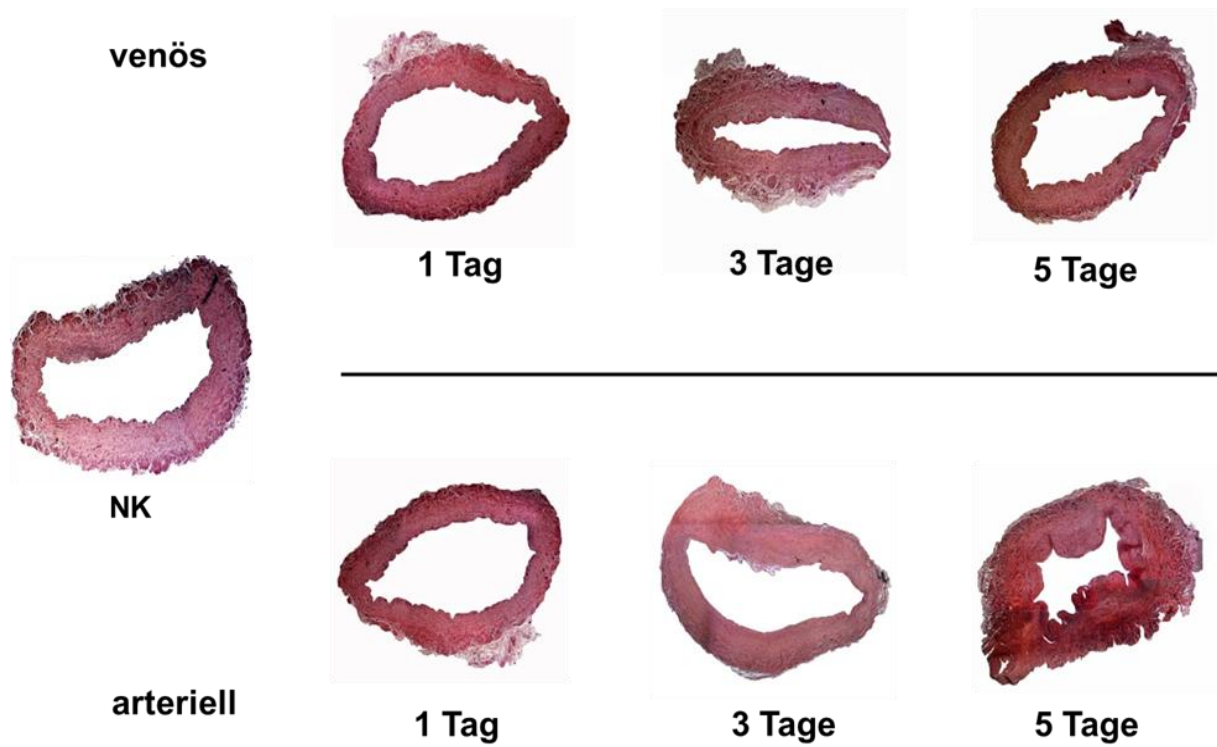


Abbildung 19: Histomorphologische Darstellung an einem repräsentativem Beispiel:
 Vergleich zwischen Kontrolle und 1, 3 und 5 Tage venös versus
 arteriell

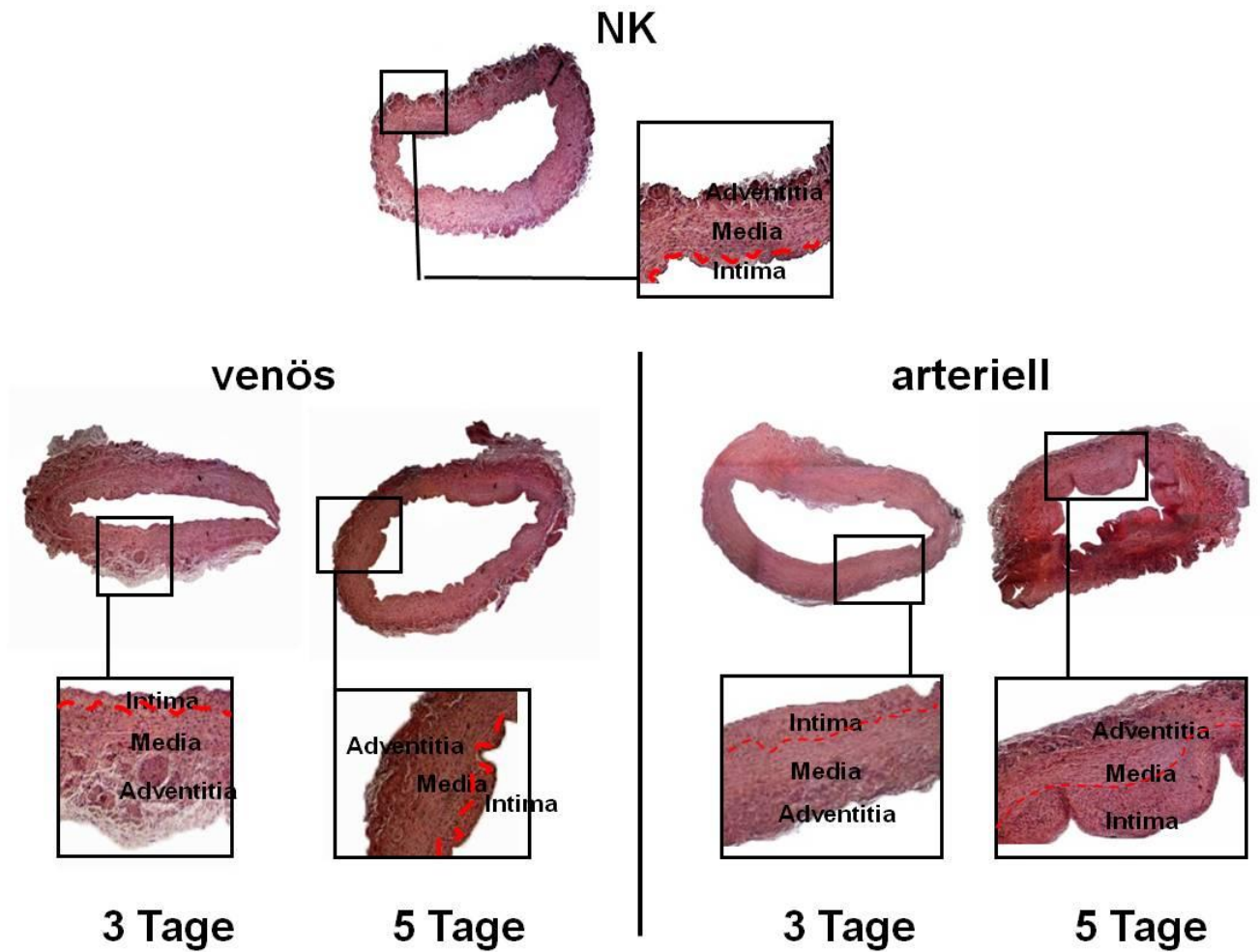


Abbildung 20: Verdeutlichung der histomorphologischen Veränderungen mit Zunahme der intimalen Hyperplasie an repräsentativen vergrößerten Bildausschnitten

3.3 Molekularbiologische Daten

3.3.1 Expressionsanalyse auf mRNA-Ebene

In der vorliegenden Studie wurde die relative Genexpression von MMP-2 und den korrespondierenden TIMPs (tissue inhibitors of metalloproteinases) im Verhältnis zum Referenzgen β -Actin untersucht. MMP-2 spielt eine zentrale Rolle in Ab- und Umbauprozessen von extrazellulärer Matrix sowie bei der Migration von glatten Muskelzellen in die Gefäßintima von vaskulärem Gewebe. Dieses Gefäßremodeling mit Ausbildung von intimaler Hyperplasie und späterer Graft-Stenose erfolgt ebenfalls bei Arterialisierung von venösen Bypassgrafts im Rahmen von aortokoronaren Bypass-Operationen. Die molekularbiologischen Prozesse, die durch die Implantation eines venösen Bypassgefäßes in das arterielle Kreislaufsystem ausgelöst werden, scheinen entscheidend zur Entstehung der Bypass-Graft-Disease beizutragen. Der Expression von MMP-2 und seinen Inhibitoren kommt bei diesen Umstrukturierungsprozessen eine tragende Rolle zu.

3.3.1.1 MMP-2 Expression

Betrachtet man die Ergebnisse für die Expression von MMP-2 getrennt für die venöse und arterielle Perfusion, so ergab dies für die venöse Situation im Vergleich zur Kontrolle eine Aufregulation um den Faktor 2,14; $p=0,93$ (Tag 1), 4,01; $p=0,15$ (Tag 3) und 4,94; $p=0,04$ (Tag 5) (Abbildung 21). Dem gegenüber zeigte sich bei arterieller Perfusion eine im Vergleich zur Kontrolle deutlich stärker erhöhte Expressionsrate von 2,60; $p=0,22$ (Tag 1), 10,53; $p=0,04$ (Tag 3) und 26,17; $p=0,001$ (Tag 5) (Abbildung 22).

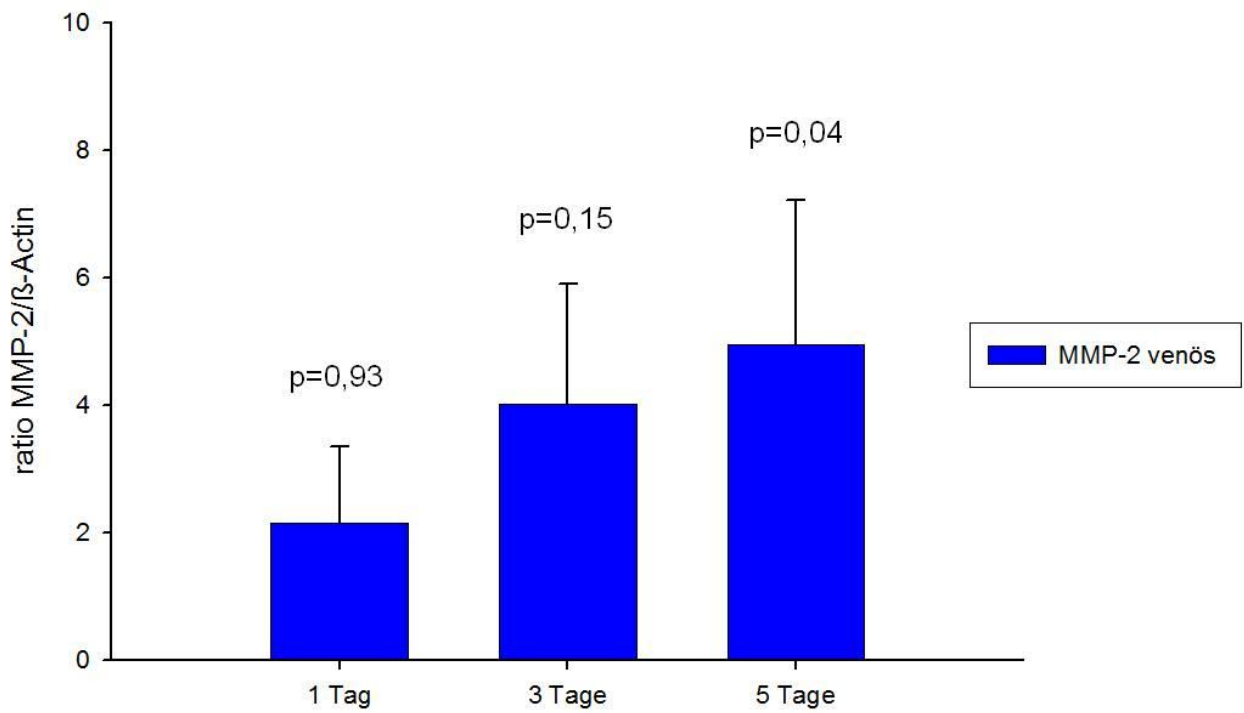


Abbildung 21: MMP-2 Expression nach 1, 3 und 5 Tagen venöser Perfusion

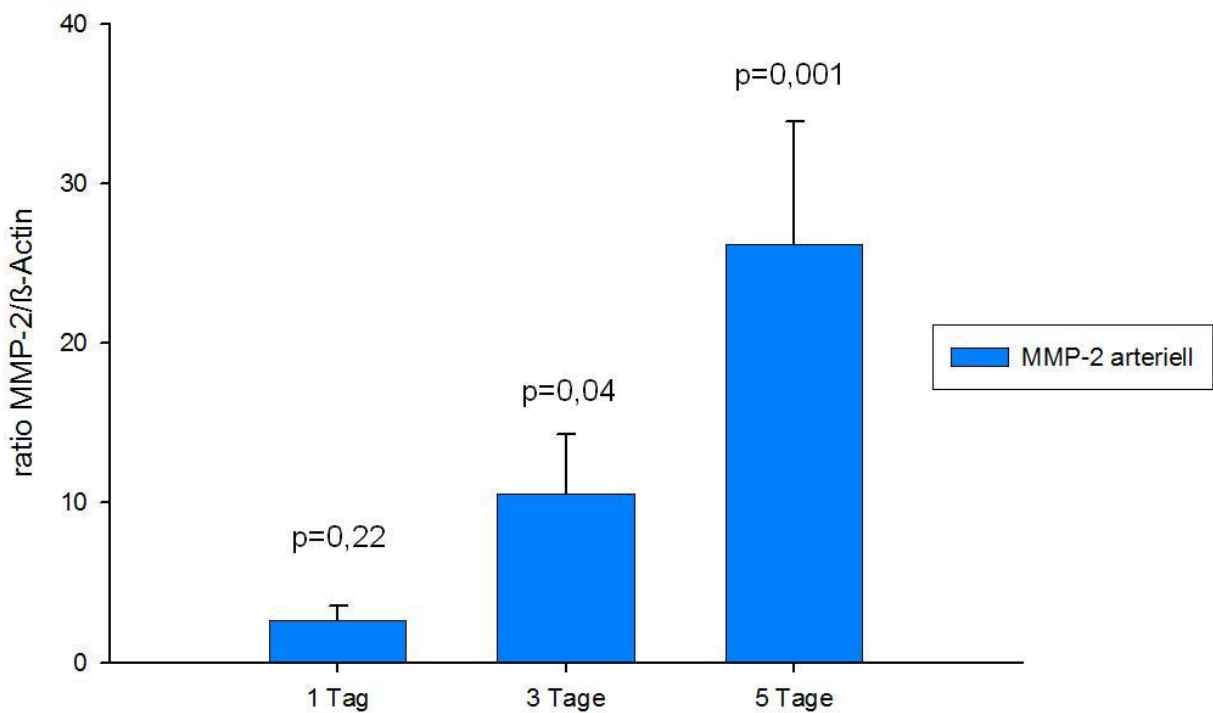


Abbildung 22: MMP-2 Expression nach 1, 3 und 5 Tagen arterieller Perfusion

Betrachtet man die Dauer der Perfusion mit venösen und arteriellen Bedingungen zu unterschiedlichen Zeitpunkten, so ergab sich nach einer Perfusion von einem Tag im arteriellen System eine leicht aufregulierte Expression (Faktor 1.21) von MMP-2, die aber nicht signifikant war ($p=0,78$). Dies änderte sich bei einer Verlängerung der Perfusionsdauer. Nach drei Tagen war die MMP-2-Expression unter arteriellen Bedingungen etwa 2,62-fach erhöht ($p=0,002$) und nach fünf Tagen stieg die Expression sogar noch weiter an (Faktor 5,30; $p=0,03$) (Abbildung 23).

Stellt man einen direkten Vergleich der absoluten MMP-2-Expression zwischen einem Tag venöser und fünf Tagen arterieller Perfusion an, so ergibt dies ein Aufregulation um den Faktor 12,23 ($p=0,009$) unter arteriellen Bedingungen (Abbildung 24).

Damit konnte eindeutig gezeigt werden, dass arterielle Druckbedingungen die Expression von MMP-2, das eine zentrale Rolle beim Gefäß-Remodeling und der Entstehung von Bypassgraft-Stenosen spielt (Anstadt et al.; 2004), in Abhängigkeit von der Perfusionsdauer signifikant erhöhen.

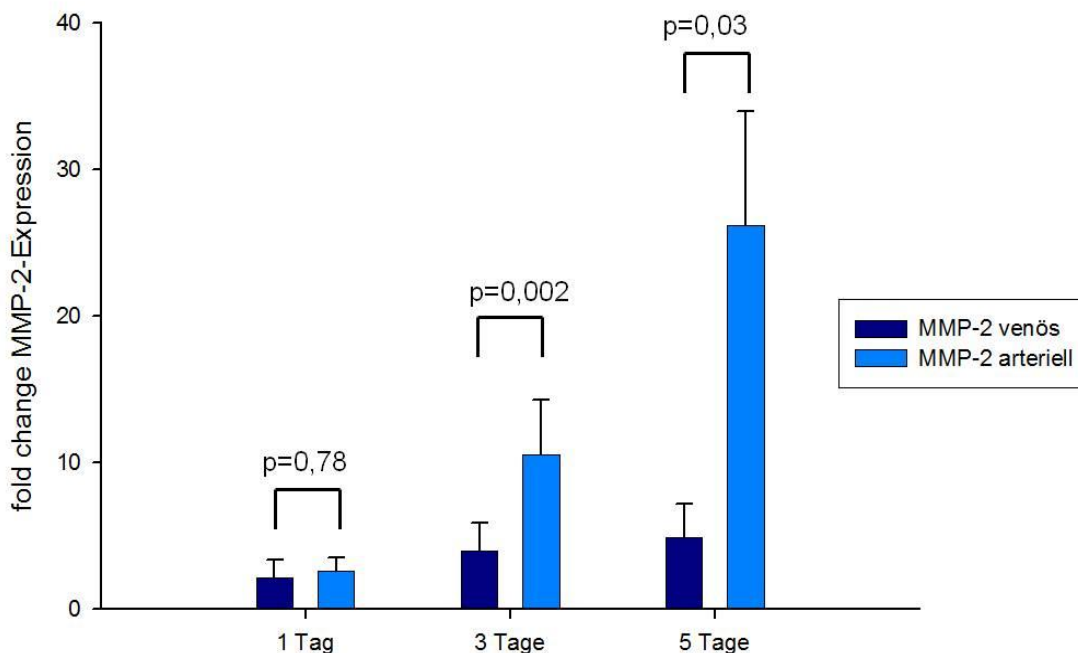


Abbildung 23: Vergleich der Expression von MMP-2 venös versus arteriell nach 1, 3 und 5 Tagen Perfusion

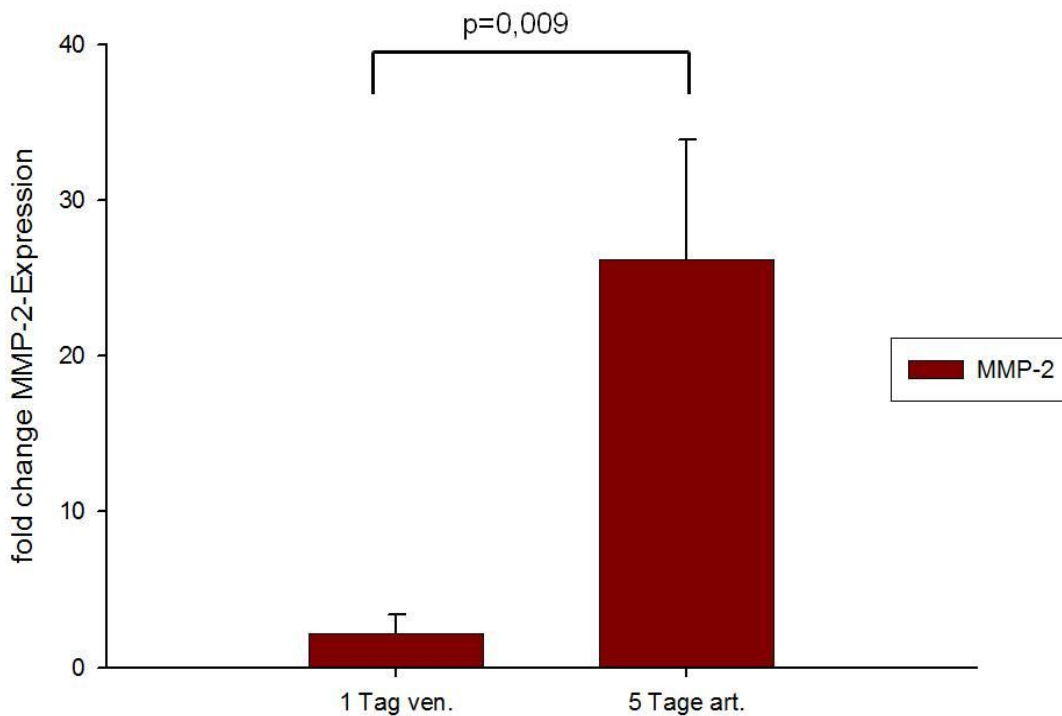


Abbildung 24: MMP-2-Expression im Vergleich zwischen einem Tag venöser und fünf Tagen arterieller Perfusion

3.3.1.2 TIMP-Expression

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Expressionsanalyse der TIMPs dargestellt. Alle TIMPs sind in der Lage, die Aktivität von MMP-2 zu regulieren, wobei sich die Affinität der einzelnen TIMPs zu MMP-2 deutlich unterscheidet (Woessner und Nagase, 2002; Edwards et al.; 1996) Der MMP-2/TIMP-2-Komplex besitzt die grösste Bindungsspezifität und TIMP-2 hat folglich die stärkste inhibitorische Wirkung auf MMP-2.

Betrachtet man die Ergebnisse für die Expression von TIMP-1, TIMP-2 und TIMP-4 getrennt für die venöse und arterielle Perfusion, so ergab dies für die venöse Situation im Vergleich zur Kontrolle eine Aufregulation bei TIMP-1 um den Faktor 1,43; p=0,26 (Tag 1), 5,87; p=0,12 (Tag 3) und 7,11; p=0,04 (Tag 5). Für TIMP-2 zeigte sich unter venöser Perfusion keine wesentliche Veränderung der

Genexpression, lediglich nach 3 Tagen Perfusion kam es zu einem leichten Anstieg der Expressionsrate, die im Verlauf aber wieder abnahm: 0,94; $p=0,62$ (Tag 1), 1,53; $p=0,24$ (Tag 3) und 0,55; $p=0,76$ (Tag 5). Ein ähnliches Bild wies die Expressionsanalyse für TIMP-4 nach 1, 3 und 5 Tagen venöser Perfusion auf: 0,07; $p=0,82$ (Tag 1), 1,29; $p=0,32$ (Tag 3) und 0,31; $p=0,78$ (Tag 5) (Abbildung 25).

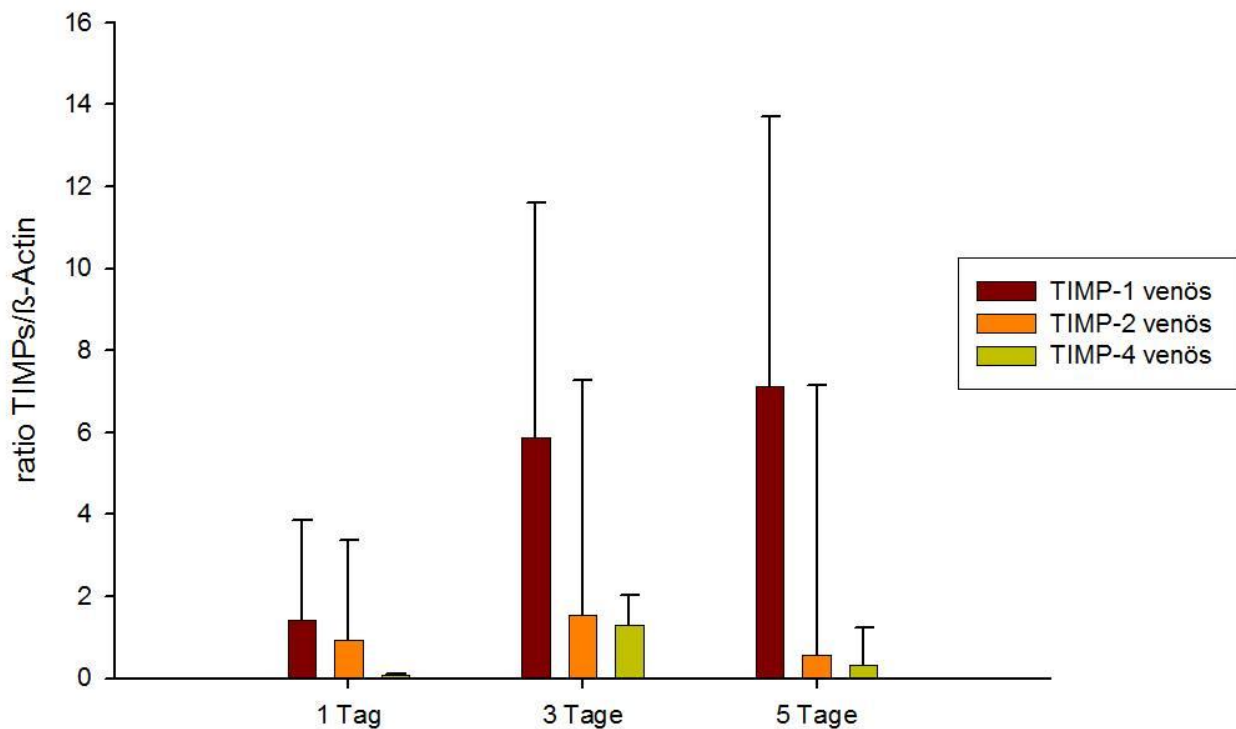


Abbildung 25: Genexpression von TIMP-1, TIMP-2 und TIMP-4 nach 1, 3 und 5 Tagen venöser Perfusion

Dem gegenüber zeigte sich bei arterieller Perfusion eine stark erhöhte Aufregulation der Expression von TIMP-1 um den Faktor 36,31; $p=0,006$ (Tag 1), 14,83; $p=0,08$ (Tag 3) und 31,35; $p=0,03$ (Tag 5). Der Trend zu einer verstärkten Aufregulation von TIMP-2 gegenüber der Kontrolle nach drei Tagen Perfusion, wie er unter venösen Versuchsbedingungen nachgewiesen werden konnte, zeigte sich ebenfalls in der arteriellen Situation: 0,62; $p=0,72$ (Tag 1), 3,81; $p=0,14$ (Tag 3) und 1,97; $p=0,34$ (Tag 5). Diese Unterschiede in der TIMP-2-Expression waren aber nicht signifikant. Betrachtet man die die Situation für TIMP-4, so ergab sich hinsichtlich der Veränderung der Expressionsrate eine stetige Zunahme der Aufregulation mit

steigender Perfusionsdauer: 2,26; p=0,24 (Tag 1), 9,79; p=0,04 (Tag 3) und 21,82; p=0,008 (Tag 5) (Abbildung 26).

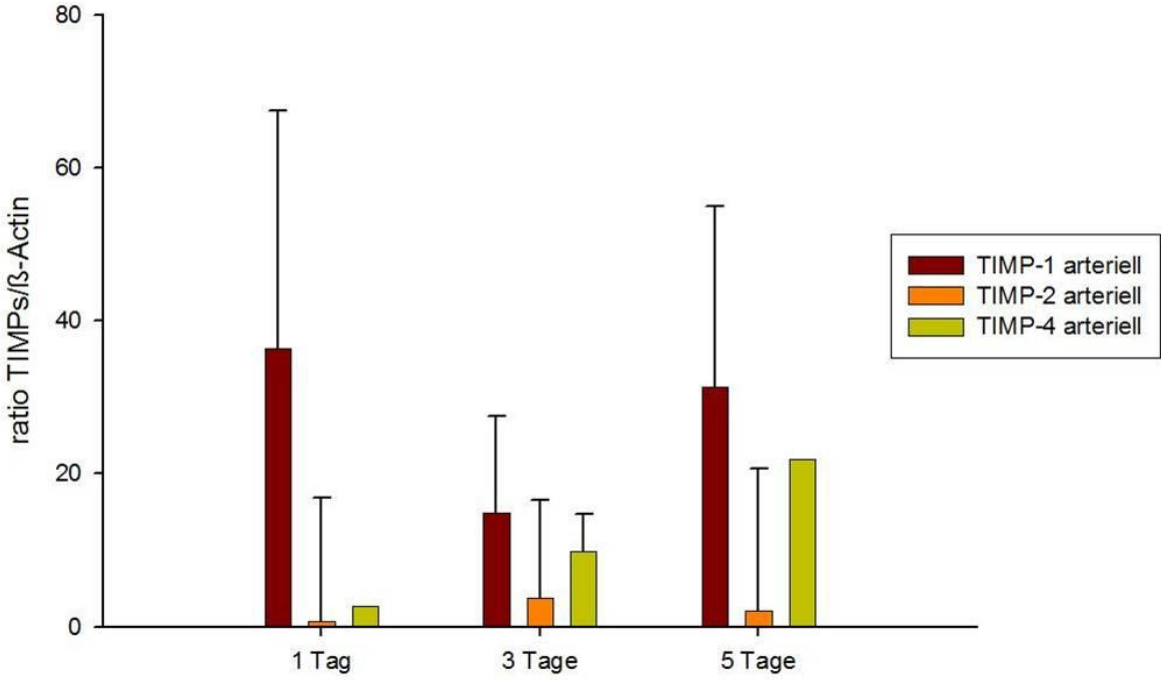
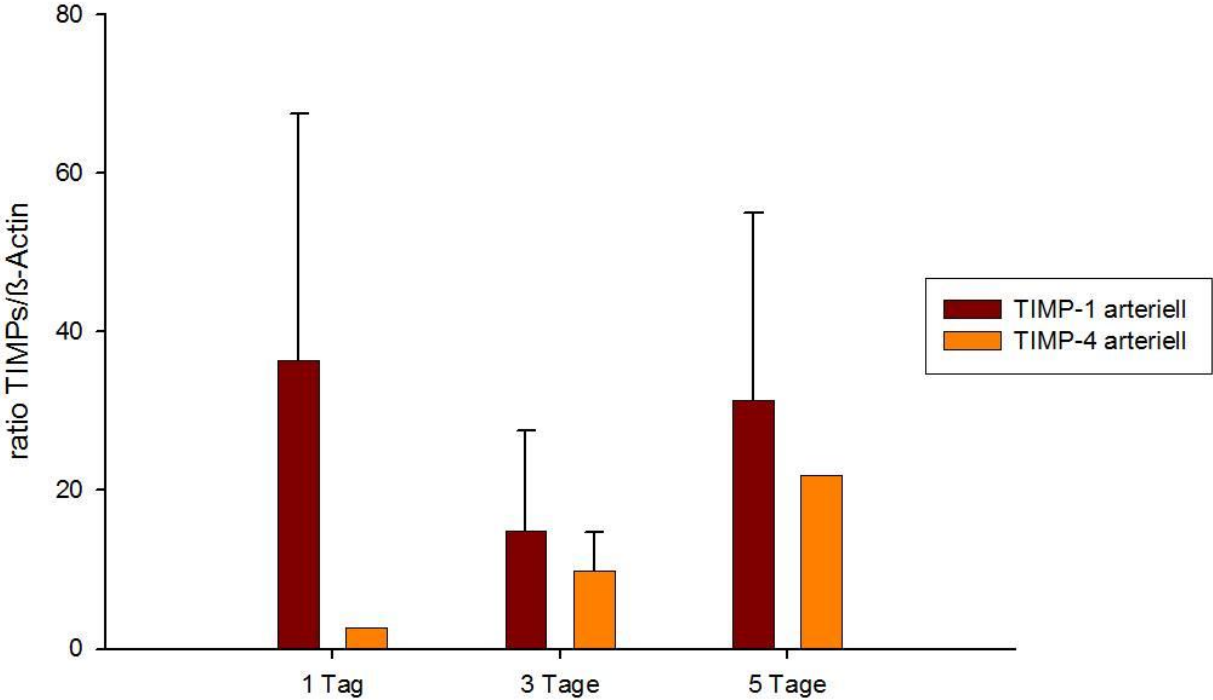
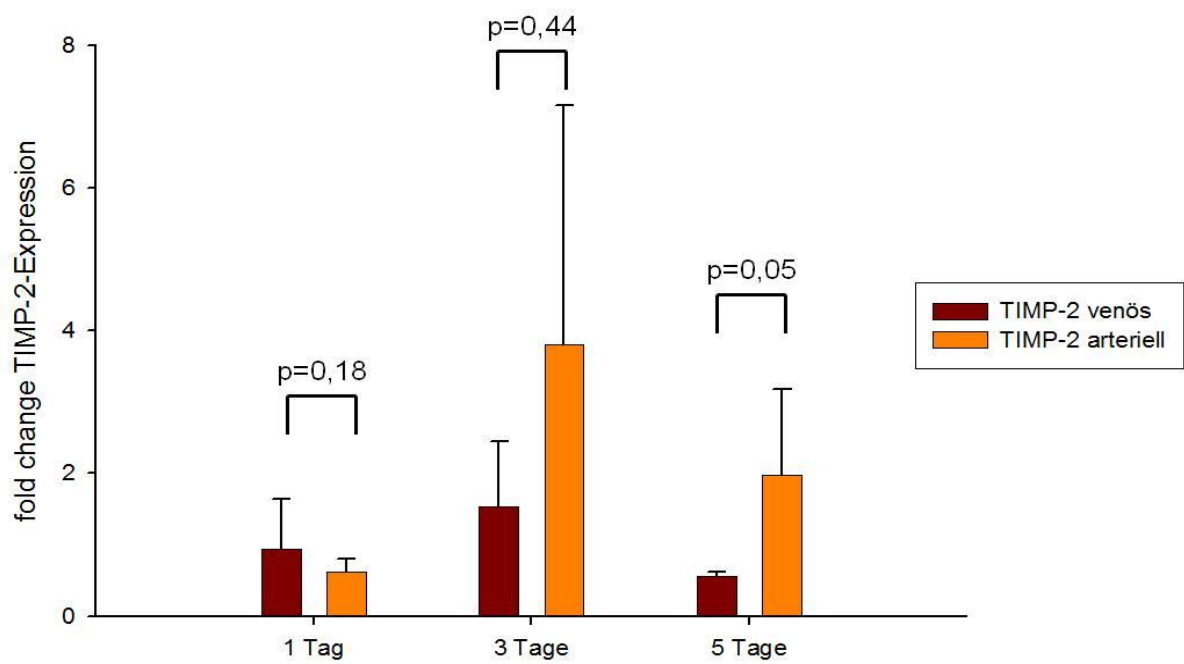
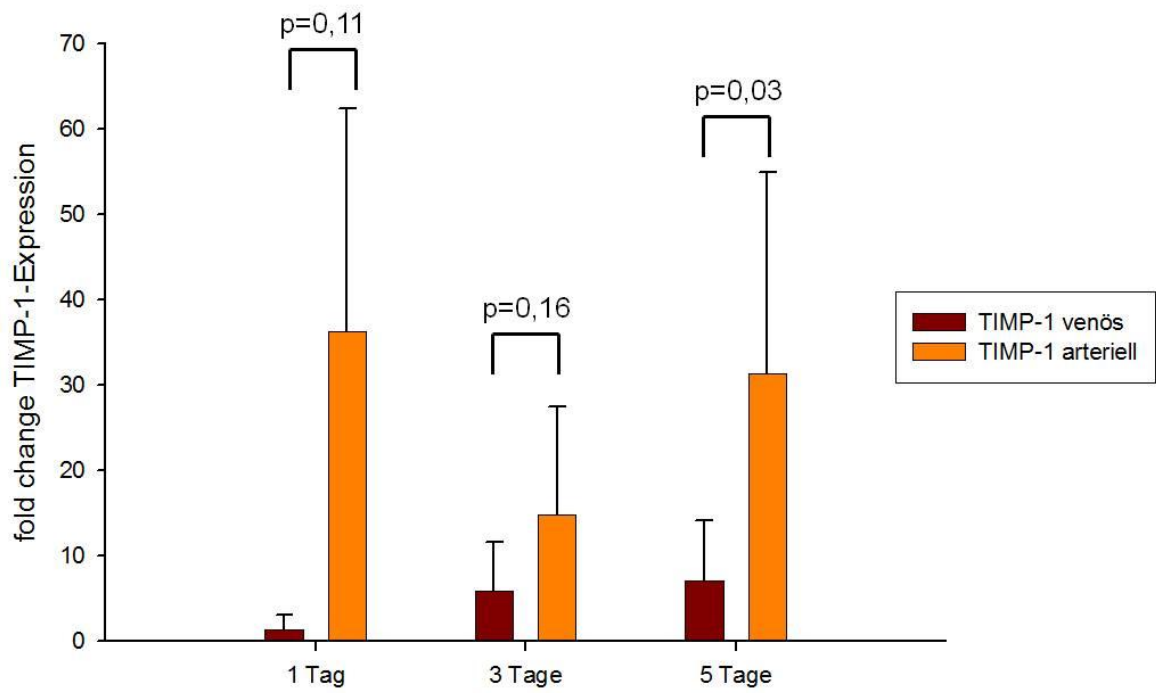


Abbildung 26: Genexpression von TIMP-1 und TIMP-4 nach 1, 3 und 5 Tagen arterieller Perfusion

Vergleicht man die Dauer der Perfusion mit venösen und arteriellen Bedingungen zu unterschiedlichen Zeitpunkten, so ergab sich nach einer Perfusion von einem Tag im arteriellen System eine Aufregulation für TIMP-1 um den Faktor 25,39; $p=0,11$ für TIMP-2 eine Expressionsrate von 0,68; $p=0,18$ und für TIMP-4 ein Wert von 9,16; $p=0,11$. Nach drei Tagen zeigte sich für TIMP-1 eine Erhöhung der Expression um 2,52; $p=0,16$, für TIMP-2 um den Faktor 2,49; $p=0,44$ und für TIMP-4 erhöhte sich die Aufregulation auf 7,58; $p=0,02$. Mit zunehmender Perfusionsdauer ergab sich nach fünf Tagen Perfusion für TIMP-1 eine Erhöhung der Expression auf 4,41; $p=0,03$, für TIMP-2 erhöhte sich die Aufregulation auf 3,58; $p=0,05$ und für TIMP-4 stieg der Wert der Genexpression auf 59,98; $p=0,003$. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass unter arterieller Perfusion eine verstärkte Aufregulation der Genexpression von TIMP-1, TIMP-2 und TIMP-4 gegenüber der venösen Kontrollgruppe erfolgte. Jedoch zeigte sich, dass über den zeitlichen Verlauf kein stetiger Anstieg der Genexpression mit zunehmender Perfusionsdauer erfolgte, sondern es innerhalb des Perfusionszeitraumes von fünf Tagen zu Auf- und Abregulationen der Expressionsrate der TIMPs kam (Abbildung 27). Allerdings ist klar ersichtlich, dass bei der längsten getesteten Perfusionsdauer alle drei TIMPs unter arteriellen Flussbedingungen signifikant stärker exprimiert wurden als in den korrespondierenden venös perfundierten Venenstücken.



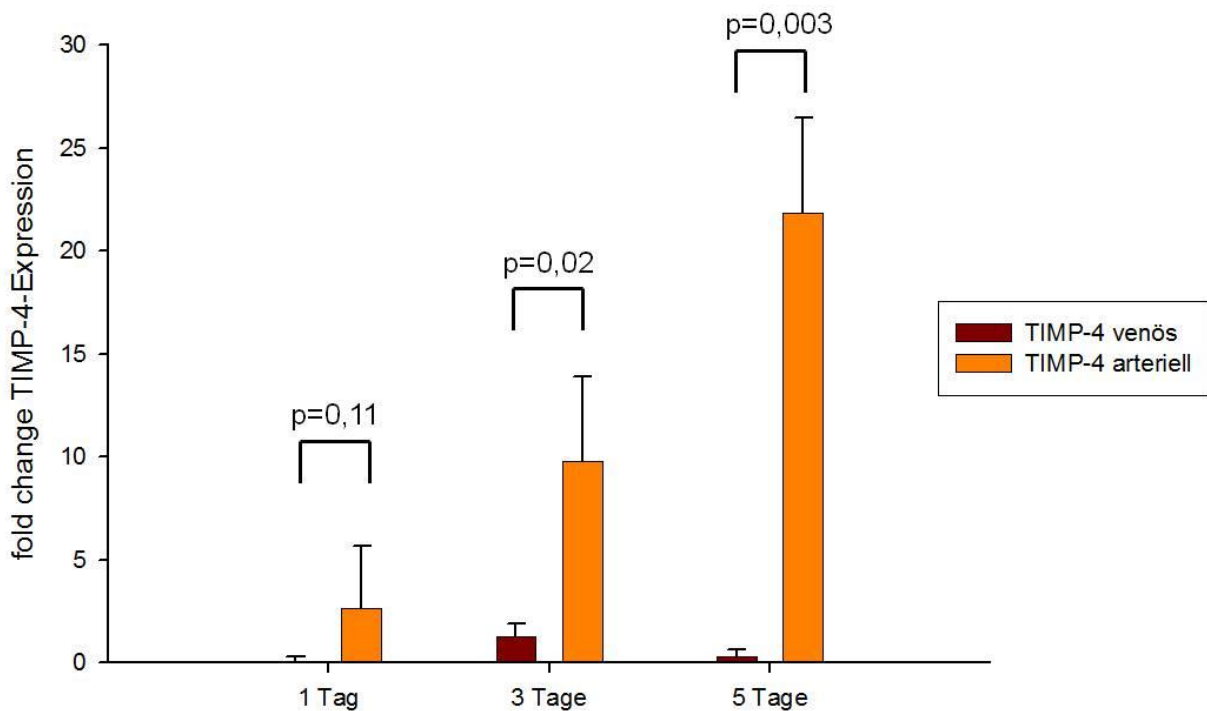


Abbildung 27: Genexpression von TIMP-1, TIMP-2 und TIMP-4 venös versus arteriell nach 1, 3 und 5 Tagen Perfusion

3.3.1.3 Verhältnis der Expression von MMP-2 zu seinen Inhibitoren (TIMPs)

Im folgenden wurde das Verhältnis der Expression von MMP-2 zu seinen Inhibitoren, den TIMPs bestimmt. Da der MMP-2/TIMP-2-Komplex bei der Inhibierung von MMP-2 die größte Aktivität aufweist, wurde dieser Komplex detailliert analysiert. Für diese Untersuchungen wurde der Wert für die Perfusion am Tag 1 unter venösen Bedingungen arbiträr gleich eins gesetzt.

Betrachtet man die Ergebnisse für die Expression von MMP-2/TIMP-2 getrennt für die venöse und arterielle Perfusion, so ergab dies für die venöse Situation im Vergleich zur Kontrolle eine Aufregulation um den Faktor 1,15; $p=0,86$ (Tag 3) und 2,95; $p=0,28$ (Tag 5) (Abbildung 28). Dem gegenüber zeigte sich bei arterieller Perfusion eine im Vergleich zum Kontrollwert erhöhte Expressionsrate von 1,85; $p=0,22$ (Tag 1) und 2,22; $p=0,14$ (Tag 3), welche mit zunehmender Perfusion noch weiter signifikant auf 6,02; $p=0,04$ (Tag 5) anstieg (Abbildung 29).

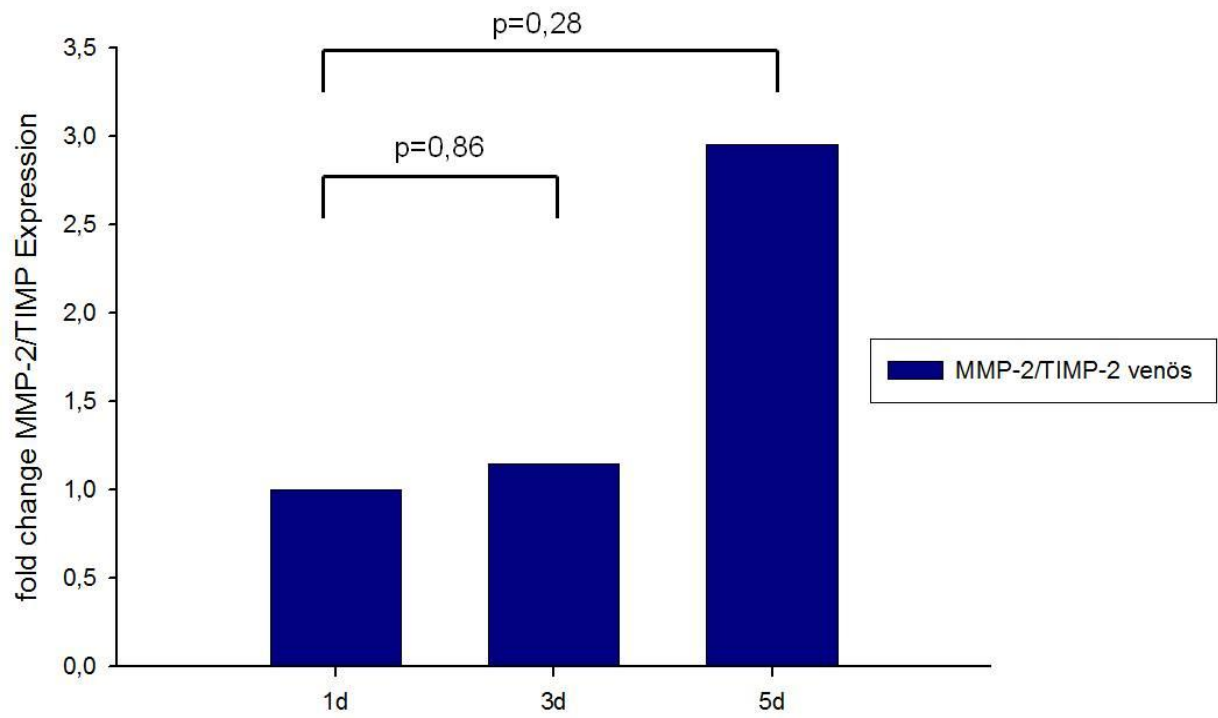


Abbildung 28: Genexpression des MMP-2/TIMP-2-Komplexes nach 1, 3 und 5 Tagen venöser Perfusion

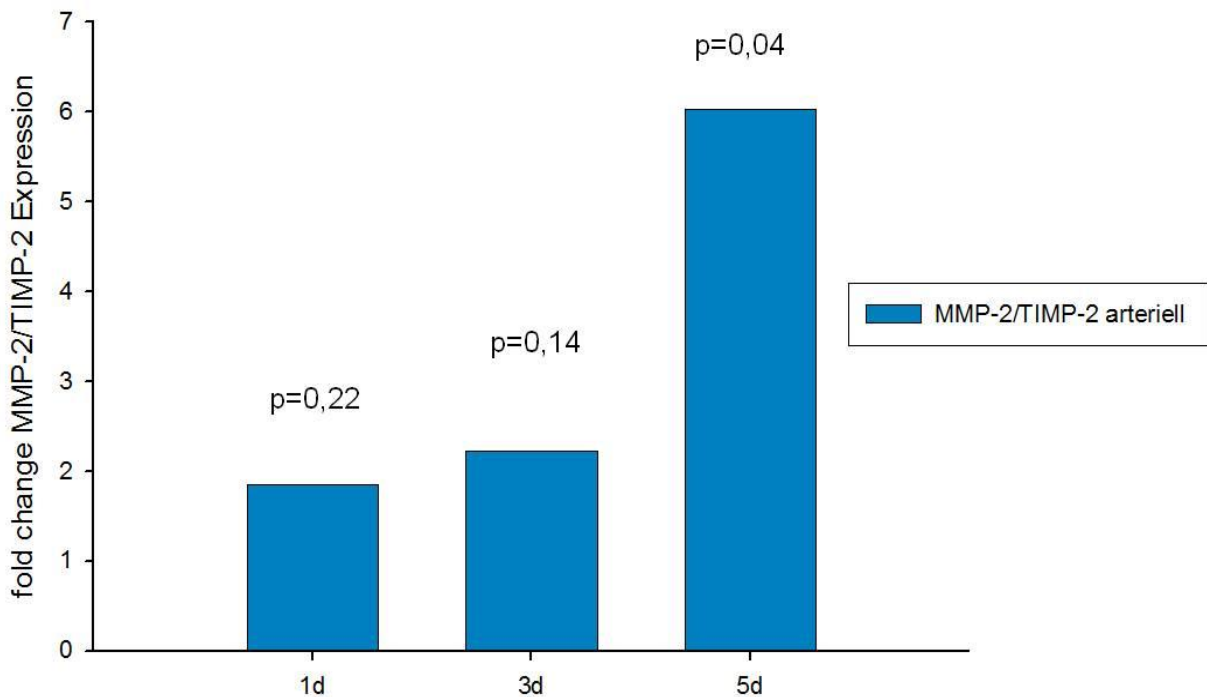


Abbildung 29: Genexpression des MMP-2/TIMP-2-Komplexes nach 1, 3 und 5 Tagen arterieller Perfusion (Referenz Verhältnis MMP-2/TIMP-2 nach 1 Tag venöser Perfusion).

Vergleicht man die Dauer der Perfusion unter venösen und arteriellen Bedingungen zu unterschiedlichen Zeitpunkten, so ergab sich nach einer Perfusion von einem Tag im arteriellen System eine leicht aufregulierte Expression (Faktor 1.85) von MMP-2/TIMP-2, welche aber nicht signifikant war ($p=0,54$). Diese stieg mit zunehmender Perfusionsdauer weiter an. Nach drei Tagen war die MMP-2/TIMP-2-Expression unter arteriellen Bedingungen etwa 1,93-fach aufreguliert ($p=0,14$) und stieg nach fünf Tagen weiter an (Faktor 2,04; $p=0,02$) (Abbildung 30).

Hiermit konnte gezeigt werden, dass sich das Verhältnis des MMP-2/TIMP-2-Komplexes mit steigender Perfusionsdauer weiter in Richtung MMP-2-Aufregulation verschoben hatte und folglich die enzymatische Aktivität von MMP-2 und die damit einhergehenden Ab- und Umbauprozesse innerhalb des Gewebes deutlich zunehmen.

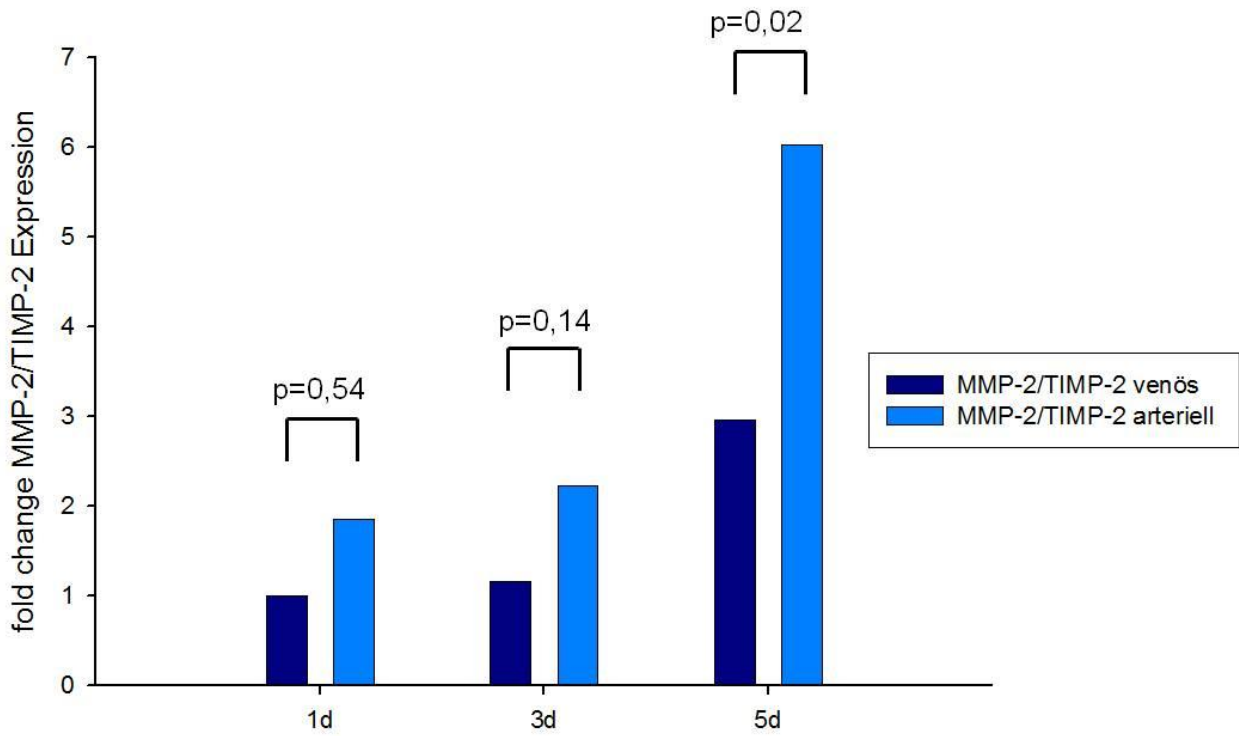


Abbildung 30: Genexpression des MMP-2/TIMP-2-Komplexes venös versus arteriell nach 1, 3 und 5 Tagen Perfusion (Referenz Verhältnis MMP-2/TIMP-2 nach 1 Tag venöser Perfusion).

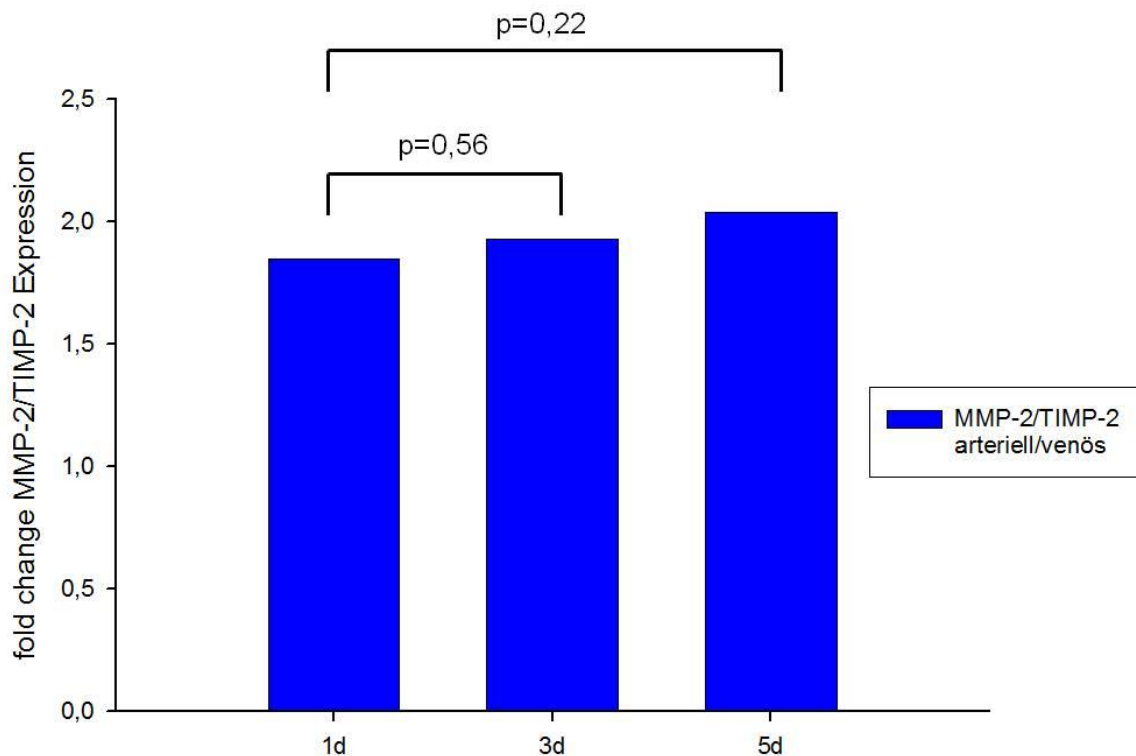


Abbildung 31: Genexpression des MMP-2/TIMP-2-Komplexes arteriell/venös nach 1, 3 und 5 Tagen Perfusion

3.3.2 Ergebnisse der Zymographie

Die Zymographie dient zur Darstellung der proteolytischen Gelatinase-Aktivität der Matrixmetalloproteinasen. Aufgrund den Ergebnissen der qRT-PCR, die eine eindeutige Aufregulation der mRNA Expression von MMP-2 zeigten, sollten diese Ergebnisse auf der Proteinebene durch einen Nachweis der Aktivität von MMP-2 (Gelatinase A) bestätigt werden.

MMP-2 wird als sogenanntes Proenzym im endoplasmatischen Retikulum synthetisiert. Die Umwandlung zur aktiven Isoform erfolgt durch Abspaltung des Propeptids durch Gewebs- und Plasmaproteinasen an der Zelloberfläche. Folglich lassen sich in der Zymographie sowohl die inaktive Vorstufe des Proenzym als auch die aktive Isoform von MMP-2 darstellen.

Für die MMP-Aktivität konnten in der Zymographie Banden für das aktive MMP-2 (72kDa) und das pro-MMP-2 (78kDa) sowohl in den unperfundierten Kontrollen als auch in den venös bzw. arteriell perfundierten Gefäßproben nachgewiesen werden. Hierbei zeigten die unperfundierten Kontrollen insbesondere die inaktive Vorstufe (pro-MMP-2) in geringen Mengen. Bei venöser Perfusion wurde vor allem die Expression dieser Isoform induziert. Ihre Aktivität war über den zeitlichen Verlauf der Versuche nahezu konstant. Unter arteriellen Perfusionsbedingungen stieg die MMP-2-Aktivität deutlich an, insbesondere wurde hierbei die aktive Isoform von MMP-2 (72kD) mit zunehmender Perfusionsdauer stärker stimuliert (Abbildung 32).

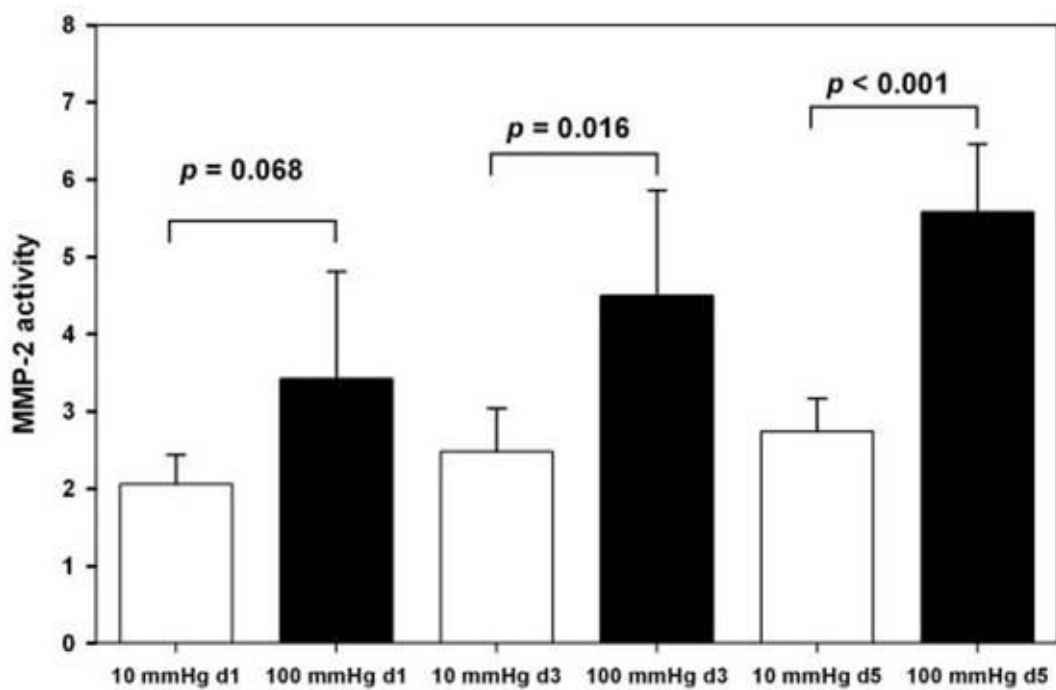
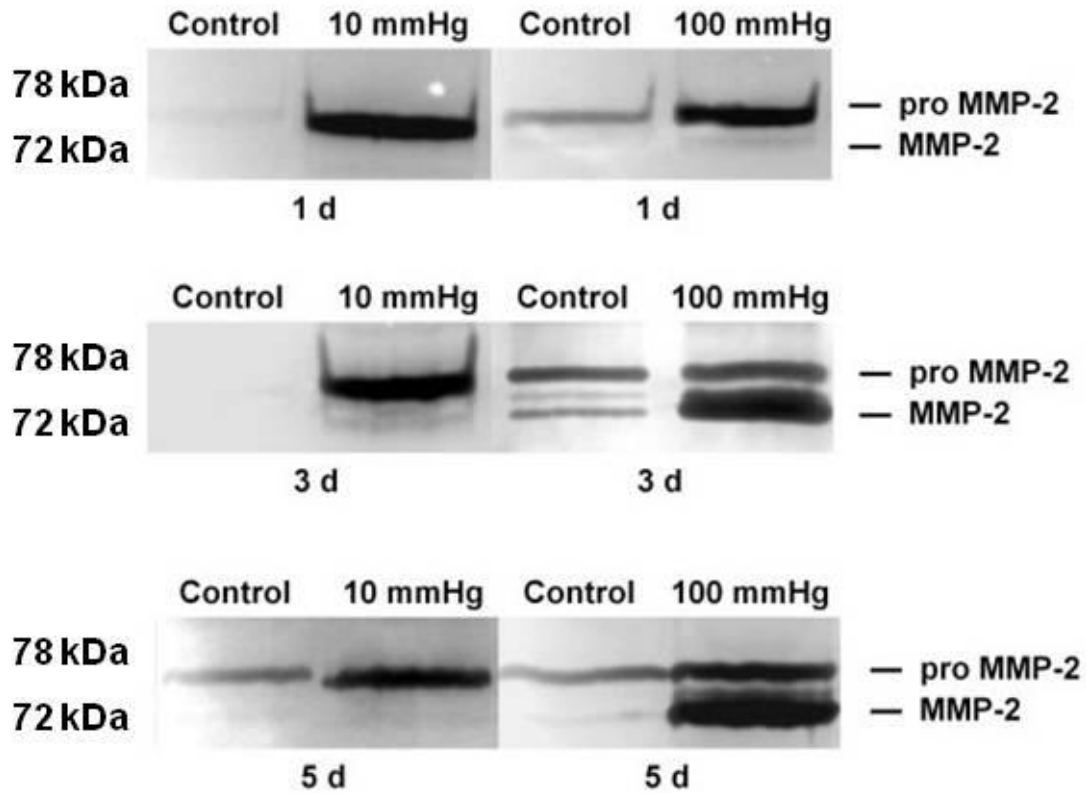


Abbildung 32: Repräsentative Gelatine-Zymographie der einzelnen Perfusionsprofile in Abhängigkeit von der Perfusionsdauer

Nach venöser Perfusion zeigte sich eine Aufregulation der MMP-2-Gesamtaktivität, dass heisst die Summe aus pro-MMP-2 und MMP-2, gegenüber der Kontrolle um den Faktor 2,1; $p=0,76$ (Tag 1), 2,7; $p=0,22$ (Tag 3) und 2,9; $p=0,09$ (Tag 5) (Abbildung 33). Hierbei blieb die Aktivität vom MMP-2 mit zunehmender Perfusionsdauer nahezu konstant.

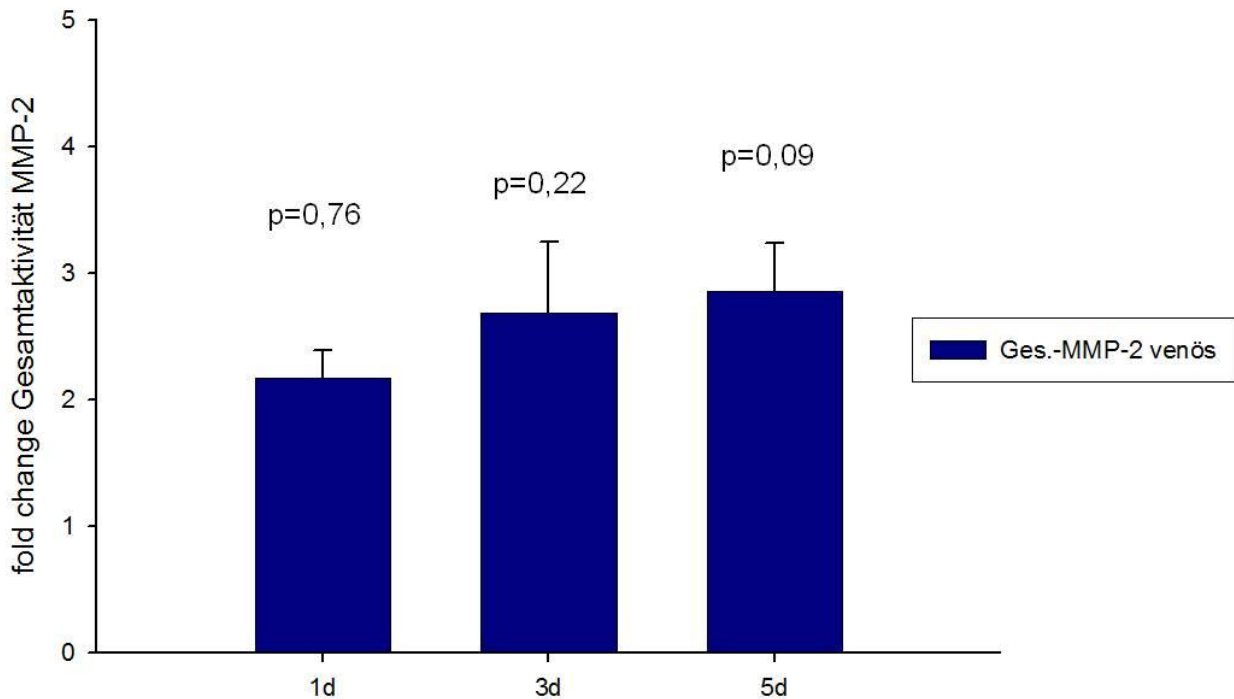


Abbildung 33: Vergleich der Gesamtaktivität von MMP-2 nach 1, 3 und 5 Tagen venöser Perfusion

Nach arterieller Perfusion wurde die proteolytische Aktivität von MMP-2 mit steigender Dauer der Perfusion deutlich stärker stimuliert: 2,2-fach; $p=0,04$ (Tag 1), 4,8-fach; $p=0,005$ (Tag 3) und 9,8-fach; $p<0,001$ (Tag 5) (Abbildung 34).

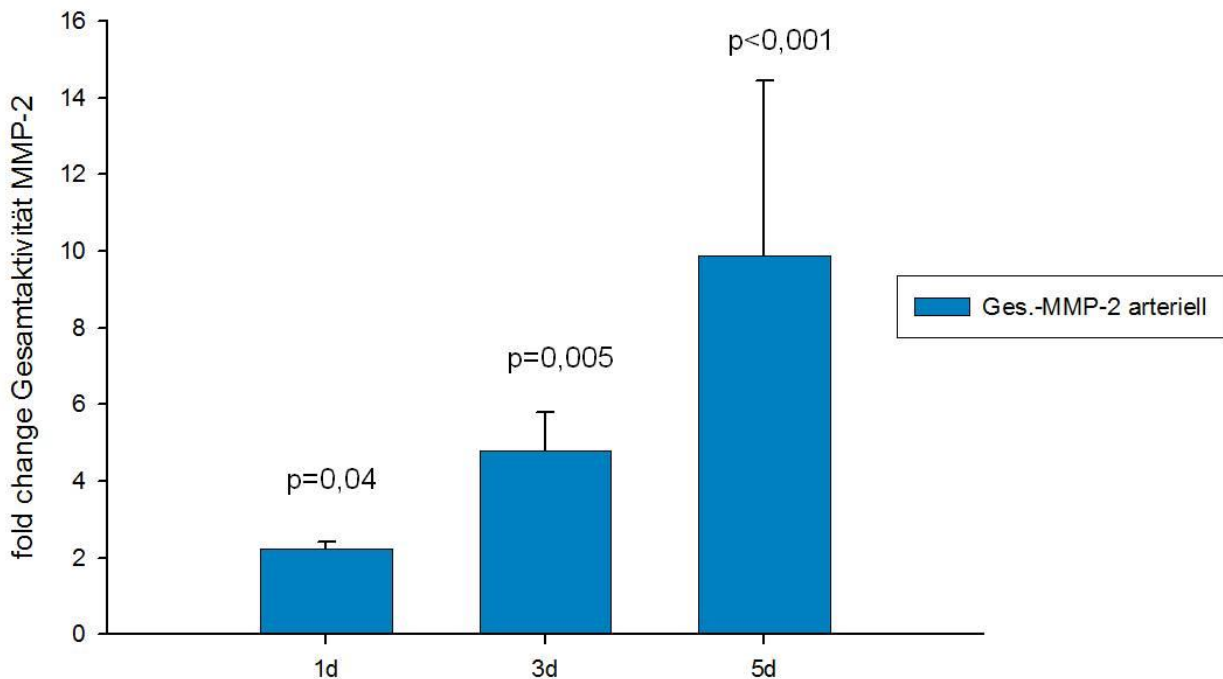


Abbildung 34: Vergleich der Gesamtaktivität von MMP-2 nach 1, 3 und 5 Tagen arterieller Perfusion

Zieht man einen direkten Vergleich zwischen arterieller und venöser perfusion an den einzelnen Tagen so ergibt sich nach einem Tag eine geringe Aufregulation von Gesamt-MMP-2 unter arteriellen Bedingungen (Faktor 1,03; $p=0,65$). Mit zunehmender Perfusionsdauer stieg die MMP-2 Aktivität nach 3 Tagen auf etwa das Doppelte an (Faktor 1,8-fach; $p=0,003$) und behielt diese gesteigerte Aktivität auch nach 5 Tagen (Faktor 3,5; $p=0,009$) (Abbildung 35). Damit konnte mit der in der qRT-PCR nachgewiesenen erhöhten Expression der MMP-2 mRNA auch funktionell auf Proteinebene eine erhöhte Aktivität von MMP-2 korreliert werden.

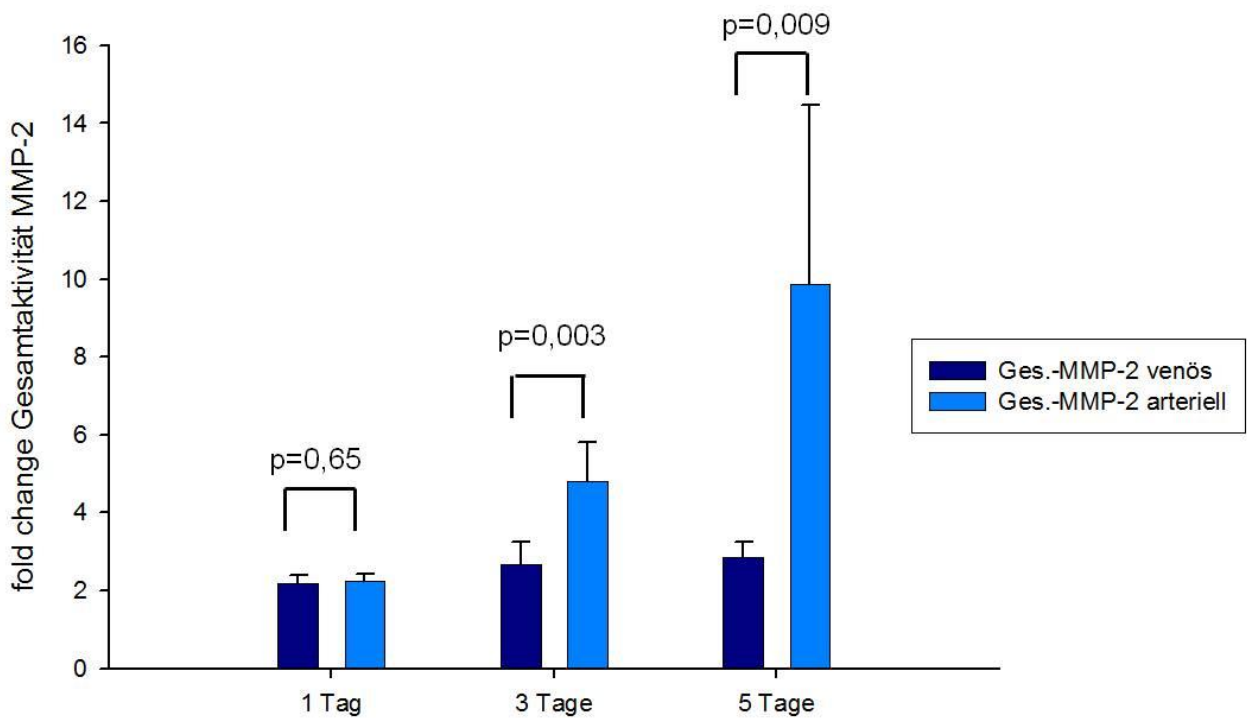


Abbildung 35: Vergleich der Gesamtaktivität von MMP-2 venös versus arteriell nach 1, 3 und 5 Tagen Perfusion

Wie bereits oben angeführt zeigte sich, dass bei Perfusion der Gefäße mit einem arteriellen Perfusionsprofil von drei Tagen oder länger vor allem die aktive 72 kD-Form von MMP-2 induziert wurde. Diese Isoform von MMP-2 war unter den gewählten experimentellen Bedingungen bei physiologischen venösen Druckbedingungen nur schwach nachweisbar. Im Gegensatz dazu erfolgte unter arteriellen Perfusionsbedingungen eine deutliche Aufregulierung. In Abbildung 37 sind diese Unterschiede nochmals graphisch dargestellt.

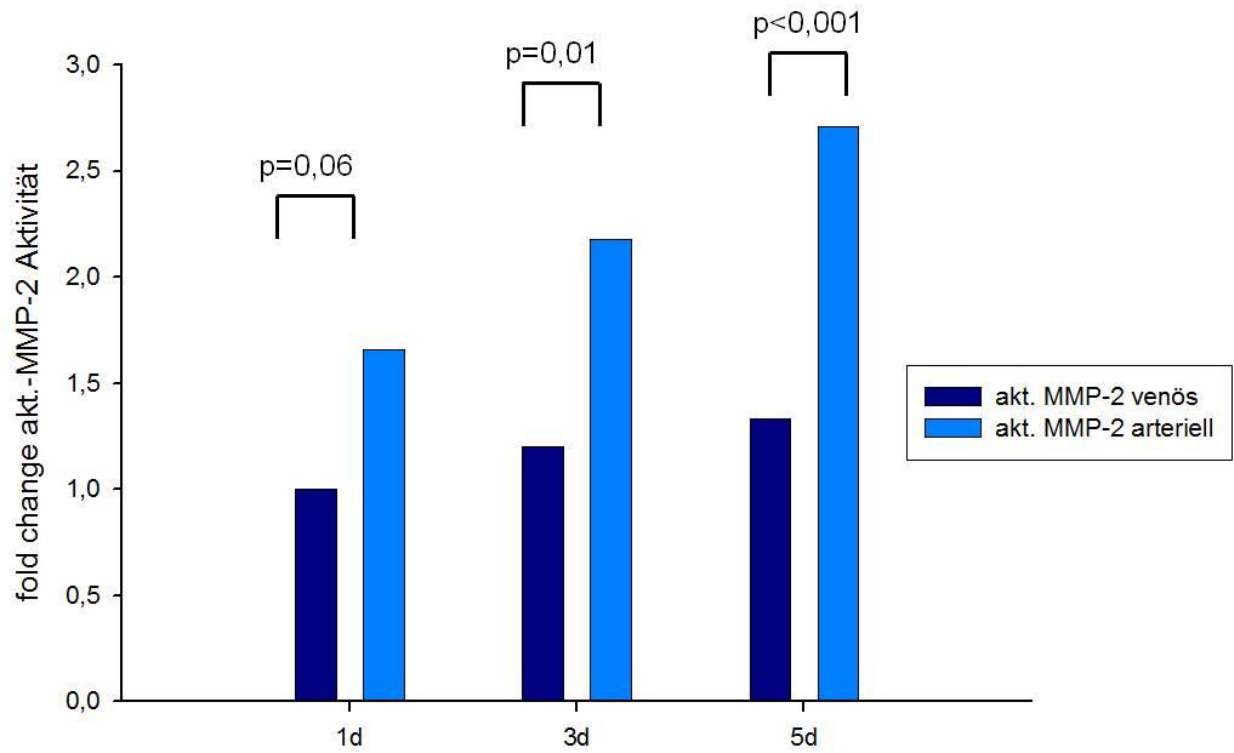


Abbildung 37: Vergleich der Expression von aktivem MMP-2 venös versus arteriell nach 1, 3 und 5 Tagen Perfusion

4 Diskussion

Die arteriosklerotisch bedingte koronare Herzkrankheit (KHK) zählt zu den führenden Todesursachen in den westlichen Industrienationen. Neben interventionellen Verfahren, wie der Ballondilatation und Stentimplantation, stellt die aortokoronare Bypasschirurgie durch Anlage autologer arterieller und venöser Bypassgrafts das wichtigste Therapieverfahren dar. Hierbei kommen venöse Gefäßimplantate insbesondere bei Mehrgefäßerkrankungen unter Verwendung der Vena saphena magna zum Einsatz (Bravata et al.; 2007; Hannan et al.; 2005). Trotz enormer Fortschritte der operativen Rekonstruktionsverfahren und medikamentöser Therapiestrategien konnte die Langzeitprognose aortokoronarer venöser Bypässe, gekennzeichnet durch die Gefäßdurchgängigkeit, nicht wesentlich verbessert werden. So zeigt sich, dass bereits ein Jahr nach Implantation 25 % der venösen Bypässe eine Okklusion aufweisen und nach 10 Jahren 50 % der Grafts verschlossen sind und 25 % multiple Stenosen aufweisen (Solymoss et al.; 2009, Fitzgibbon et al.; 1996). Um die Pathomechanismen und molekularbiologischen Parameter, die zum Remodeling des Bypassgrafts nach Einbringung in das arterielle Gefäßsystem und damit einhergehend zur Ausbildung einer vorzeitigen Venengraftokklusion führen besser verstehen zu können, haben wir ein System entwickelt, welches *ex vivo* die Perfusion von venösen Bypassgrafts unter standardisierten und reproduzierbaren Bedingungen ermöglicht.

In der vorliegenden Arbeit wurden folglich zwei Schwerpunktziele gesetzt:

- 1) Die Entwicklung und Etablierung eines artifiziellen Perfusionssystems zur Durchführung von standardisierten und reproduzierbaren Perfusionsversuchen
- 2) Die Untersuchung der Einflüsse von arteriellen Perfusionsbedingungen im Vergleich zur venösen physiologischen Situation auf histologische und molekulare Veränderungen von humanen venösen Bypassgefäße *ex vivo* in einem artifiziellen Perfusionssystem

4.1 Entwicklung und Etablierung des artifiziellen Perfusionssystems

In der Vergangenheit wurden zahlreiche Versuchsmodelle zur Untersuchung des Einflusses verschiedener Perfusions-, Druck- und Flussbedingungen auf venöse Bypassgefäße entwickelt. Zunächst erfolgten diese in einfachen Kultivierungssystemen unter statischen Bedingungen im Zell-Inkubator (Joddar et al., 2011; Porter et al., 1998; Masood et al., 1997; Soyombo et al., 1990). Aufgrund der limitierten Aussagekraft dieser statischen Versuchsbedingungen wurde eine Weiterentwicklung der Versuchsdurchführungen durch einige Arbeitsgruppen angestrebt, um genauere Untersuchungen zum Einfluss von von Perfusions-, Druck- und Flussbedingungen auf venöse Bypassgefäße in *ex vivo* Systemen durchzuführen. (Ander et al., 2005; Conklin et al., 2000; Gusic et al., 2005; Paroz et al., 2004; Rey et al., 2004; Saucy et al.; 2010). Hierbei stand vor allem die Berücksichtigung der hämodynamischen Einflüsse und des intakten physiologischen Gewebeverbandes innerhalb eines Gefäßes und die damit einhergehende Gewährleistung des Zell-Zell-Kontaktes in der Umgebung der extrazellulären Matrix und die Möglichkeit zum Informationsaustausch zwischen den Zellen im Vordergrund der Weiterentwicklung dieser Systeme. Die Umsetzung dieser avisierten Versuchsbedingungen war mit einem deutlichen Mehraufwand an Gerätschaften und bei der Durchführung der Versuche verbunden. Die Entwicklung eines artifiziellen Perfusionssystems, welches unter standardisierten und reproduzierbaren Bedingungen die Durchführung von verschiedenen hämodynamischen Perfusions-, Druck- und Flussversuchen an venösen Bypassgefäßen *ex vivo* innerhalb des physiologisch intakten Gewebeverbandes ermöglicht, konnte durch unsere Arbeitsgruppe realisiert werden. Unser System erlaubt vergleichende Untersuchungen durch die Möglichkeit, jeweils zwei Perfusionskreisläufe parallel zu betreiben.

4.2 Anforderungen und Aufbau des artifiziellen Perfusionssystems

Um den Ansprüchen einer standardisierten und reproduzierbaren Versuchsdurchführung mit dem artifiziellen Perfusionssystem gerecht zu werden und um eine Optimierung und Weiterentwicklung bestehender Systeme vornehmen zu können, mussten einige Anforderungen an ein solches System erfüllt werden:

- Standardisiertes Einbringen der physiologisch intakten Gefäßprobe in den Perfusionskreislauf
- Gewährleistung der Dichtigkeit und Sterilität des Systems während eines Versuches
- Aufrechterhaltung konstanter Versuchsparameter wie Druck- und Flussrate über die Dauer eines Versuches
- Zentrale Erfassung und Speicherung der Versuchsdaten über eine Kontroll- und Steuereinheit
- Aufrechterhaltung einer physiologischen Temperatur von 37°C und eines konstanten pH-Wertes von 7,4

Diese notwendigen Anforderungen an ein artifizielles Perfusionssystem konnten mit unserem System realisiert werden.

4.3 Probenmaterial

Zur Durchführung der Versuche wurden humane venöse Gefäßproben herangezogen, die bei elektiven aortokoronaren Venenbypass-Operationen im Deutschen Herzzentrum München gewonnen wurden. Humane venöse Gefäßproben stellen die am häufigsten verwendeten Bypassgrafts dar und stehen somit auch in einer für Versuchszwecke ausreichenden Fallzahl zur Verfügung. Daher wurden solche Gefäße bereits von einigen Arbeitsgruppen, die sich mit der Fragestellung zur Bypassgraft-Stenose und Okklusion von venösen Grafts beschäftigen, verwendet. (Ander et al., 2005; Mavromatis et al., 2000; Masood et al., 1997; Paroz et al., 2004; Saucy et al., 2010). Somit liegen hierfür zahlreiche Erkenntnisse vor, die mit den eigenen Ergebnissen verglichen und diskutiert werden können. Für die Studienversuche wurden Venengrafts von insgesamt 35 Patienten (Durchschnittsalter $73,77 \pm 6,03$ Jahre; 9 weiblich, 26 männlich) verwendet. Die Entnahme der nichtvarikösen Venen (Vena saphena magna) erfolgte endoskopisch

unter sterilen Bedingungen. Hierbei wurde darauf geachtet, dass makroskopisch sichtbar veränderte oder thrombosierte Gefäße nicht mit in die Studienversuche einfließen. Die Venengrafts wurden bis zur Implantation in autologem Patientenblut bei Raumtemperatur im Operationssaal aufbewahrt. Ein Teil des Grafts wurde direkt in Ringerlösung gegeben und auf Eis in das experimentelle Labor zur weiteren Bearbeitung transferiert. Die Zeitspanne von der Venenentnahme bis zur Einbringung in das artifizielle Perfusionssystem betrug dabei weniger als eine Stunde. Durch das standardisierte Einbringen der Gefäßprobe in den Perfusionskreislauf anhand eines festen Versuchsablaufes durch die jeweils gleiche Person und unter sterilen Bedingungen in einer Laminar Airflow Hood konnten hierbei potentiell entstandene Fehlerquellen vermieden werden.

4.4 Technischer Aufbau des artifiziellen Perfusionsmodells

4.4.1 Perfusionskreislauf

Nahezu alle gängigen Perfusionssysteme bestehen zumeist aus einer Kombination von einer Pumpe, einer Gefäßkammer mit der Gefäßprobe, dem Schlauchsystem und einer Temperatur- und Druckeinstellung (Schwartz et al., 1996; Berceli et al., 1991; Patterson et al., 2001; Mavromatis et al., 2000; Surowiec et al., 2000). Diese Komponenten stellen die Mindestanforderungen an einen Perfusionskreislauf dar und das Setup kann je nach Versuchsvorhaben und Mehraufwand an Gerätschaften beliebig erweitert werden. Die bestehenden Systeme sind häufig unausgereift und dadurch limitiert bezüglich ihrer Größe, den Kosten und der Komplexität der Anwendbarkeit.

Unser Perfusionskreislauf beinhaltet die von einem Zylinder umgebene Gefäßhalterung mit der Gefäßprobe, das Silikonschlauchsystem mit in Reihe geschalteten Drucksensoren und die Rollerpumpe. Durch die Nutzung von Edelstahl und biokompatiblen Kunststoff für die Gefäßhalterung, wie sie von zahlreichen Arbeitsgruppen verwendet werden (Rey et al., 2004, Conklin et al., 2000), sind hierbei keine Interaktionen oder Auswirkungen auf die Gefäßprobe und Auswertung von Versuchsparametern anzunehmen. Durch das Anbringen zweier Stellschrauben zur Justierung der Gummidichtungen, lässt sich der Zylinder mit der Gefäßhalterung dicht verschließen, so dass eine Dichtigkeit bis 400mmHg gewährleistet und das Eindringen von Keimen in das System und somit eine Kontamination der Gefäßprobe

vermieden werden kann. Insbesondere bei Langzeitversuchen stellt eine mögliche Kontamination der Gefäßprobe ein großes Problem dar (Paroz et al., 2004). Hiermit bietet das in sich geschlossene Gefäßsystem große Vorteile gegenüber offenen Perfusionskreisläufen (Labadie et al., 1996; Golledge et al., 1997). Eine weitere Verbesserung im Vergleich zu bestehenden Systemen ist die Möglichkeit, Gefäßproben unterschiedlicher Länge und Durchmesser in das System einzubringen und auf die physiologische Gefäßlänge einzustellen (Gusic et al., 2005; Patterson et al., 2001). Durch die Verwendung zweier Perfusionssysteme können mit unserem artifizialen Perfusionssystem bis zu vier Gefäßproben parallel perfundiert werden.

Betrieben wird der Perfusionskreislauf durch eine Rollerpumpe, die sowohl einen pulsartigen nicht-statischen Fluss als auch einen laminaren Fluss mit einer Frequenz zwischen 1ml/min und 160ml/min erzeugen kann. Dies bietet einen weiteren Vorteil gegenüber Systemen, welche nur eine Flussform generieren können (Miykawa et al., 2008). Für die Studienversuche wurden physiologische Flussraten von 5ml/min für venöse Versuchsbedingungen und 50ml/min für die arterielle Perfusion verwendet (Miykawa et al., 2008; Muluk et al., 1998), um die *in vivo* Situation möglichst exakt abzubilden. Das Füllvolumen des gesamten Perfusionskreislaufs beträgt 12 ml und konnte verglichen mit anderen Systemen, welche ein Volumen bis zu 500 ml benötigen, sehr klein gehalten werden (Labadie et al., 1996; Porter et al., 1996; Surowiec et al., 2000). Dieses kleine Volumen ermöglicht die definierte Zugabe von Substanzen über einen Dreiwegehahn in laufenden den Kreislauf unter Berücksichtigung notwendiger Konzentrationen dieser Stoffe und unter ökonomischen Aspekten.

Analog zu Conklin et al. und Schwartz et al. wurde DMEM/Ham's F-12 mit 10% FCS, 2mM Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin als Perfusionsmedium verwendet (Conklin et al., 2000; Schwartz et al., 1996). Für längere Versuchszeiten wurde das Perfusionsmedium alle zwei Tage gewechselt, um für die Dauer des Versuches einen konstanten pH-Wert von 7,4 zu gewährleisten (Rey et al., 2004). Eine Einspeisung von Sauerstoff und Kohlenstoffdioxid in den Perfusionskreislauf (Ander et al., 2005; Gusic et al., 2005) zur Aufrechterhaltung des physiologischen pH-Wertes und damit einhergehend ein Mehraufwand des Versuchsaufbaus ist folglich nicht notwendig.

4.4.2 Heizung und Gehäuse

Die Aufgabe der Heizung ist die Regelung und Aufrechterhaltung einer konstanten Temperatur während der Perfusionsversuche. Im Gegensatz zu anderen Gruppen, welche ihr Perfusionssystem innerhalb eines Zell-Inkubators ausführen und größere Gerätschaften wie Pumpen außerhalb platzieren müssen (Surowiec et al., 2000; Saucy et al., 2010), verwenden wir eine speziell für das Perfusionssystem entwickelte Wärmekammer aus Styrodur und einen Wärmeaustauscher als Heizmedium, welcher mittels Wasserbad erwärmt wird. Dieser Aufbau ermöglicht es, dass sowohl der eigentliche Gefäßzylinder mit der Gefäßprobe als auch die notwendigen Gerätschaften wie Rollerpumpe und Perfusorpumpe innerhalb der wärmeisolierten Versuchskammer angeordnet sind. Die gewünschte Zieltemperatur von 37°C kann über einen externen Regler mit einer maximalen Abweichung von $\pm 0,5^\circ\text{C}$ konstant eingestellt werden. Die Protokollierung der Temperatur während eines Versuches erfolgt über ein digitales Thermometer innerhalb der Versuchskammer, dessen Messwerte am Computer erfasst und gespeichert werden.

4.4.3 Druckregelkreis

Der Druckregelkreis hat die Aufgabe, den gewünschten Zieldruck im Perfusionskreislauf einzustellen und aufrecht zu erhalten. In den Pilotversuchen stellte sich heraus, dass es trotz nicht offensichtlicher Leckage innerhalb des Systems zu einem permanenten Druckabfall während eines Versuchsablaufes kam. Dieser Druckverlust beruhte wahrscheinlich auf einer geringen Diffusion der Perfusionsflüssigkeit über das Schlauchsystem (Park et al., 2005) oder war durch die autologe Relaxation der Gefäßprobe bedingt. Um diesen Druckverlust zu unterbinden, wurde eine Perfusorpumpe über einen Dreiwegehahn mit dem Perfusionskreislauf verbunden. Über eine digitale Schnittstelle wird die Perfusorpumpe vom Rechner aus gesteuert. Hierfür werden die Daten der Drucksensoren mit dem gewünschten Zieldruck verglichen und der Druck per Computer über die Perfusorpumpe angepasst. Der zusätzliche Einfluss der Rollerpumpe auf den Druck wird durch die Drucksensoren ebenfalls erfasst und berücksichtigt. Über diesen Druckregelkreislauf lässt sich ein konstanter mittlerer Druck mit einer maximalen Abweichung von $\pm 2\text{mmHg}$ erzielen. Diese

Aufrechterhaltung konstanter Druckverhältnisse war insbesondere für Langzeitversuche entscheidend, um den Einfluss des Perfusionsdrucks auf die Gefäßprobe und damit einhergehend auf molekularbiologische Veränderungen untersuchen zu können. Eine solch genaue Drucksteuerung wurde bisher bei keinem anderen bisher publizierten Perfusionssystem beschrieben.

4.4.4 Kontroll-Steuereinheit und Software

Das artifizielle Perfusionssystem beinhaltet eine Kontroll- und Steuereinheit, welche einen Computer mit zugehörigem Monitor umfasst. Hierbei konnte mit Hilfe eines Programmes in Java eine Benutzeroberfläche zur Einstellung sowie Bedienung des Systems entwickelt werden, um den avisierten Mitteldruck im Perfusionssystem einzustellen. Durch die Steuereinheit wird innerhalb eines Versuchsablaufes für den Druck und für die Temperatur zu definierten Zeitpunkten ein Messwert gespeichert. Anhand der Benutzeroberfläche ist es möglich, zwei Perfusionskreisläufe unabhängig voneinander zu bedienen.

Somit lassen sich für jeden Kreislauf individuell die Flussrate der Perfusion und der Zieldruck im System einstellen. Damit können alle Parameter der Druck- und Flussteuerung zentral durch die Benutzeroberfläche vorgegeben werden und die unabhängige Einstellung von Druck und Fluss ermöglichen Einzelfaktorstudien. Diese neue Option, zwei Perfusionskreisläufe parallel zu betreiben, ermöglichte es, Gefäßproben des gleichen Patienten simultan sowohl unter venösen als auch unter arteriellen Versuchsbedingungen zu perfundieren und somit bei der Auswertung der Ergebnisse auf den gleichen genetischen Hintergrund der Probe zurückzugreifen. Damit bietet unser Perfusionsmodell einen großen Vorteil gegenüber anderen Gruppen, welche aufgrund der Limitationen ihrer Perfusionssysteme oder aus Mangel an Probenmaterial nur einen Kreislauf und damit Gefäßproben ausschließlich unabhängig voneinander untersuchen können (Labadie et al., 1996; Golledge et al., 1997; Saucy et al., 2010).

4.5 MTT-Assay zur Vitalitätsmessung

Nach der technischen Etablierung des Perfusionssystems sollte zunächst untersucht werden, wie lange die Gefäßproben bei unterschiedlichen Fluss- und Druckbedingungen *ex vivo* lebensfähig blieben. Hierbei wurden in Pilotversuchen

zunächst Gefäßproben mit 10 mmHg (physiologisch), 100 mmHg (arteriell) oder 200 mmHg (pathologisch) perfundiert. Gleiches wurde für die Zeitdauer untersucht, indem Gefäßproben unter konstanten Druckbedingungen zwischen einem und vierzehn Tagen perfundiert wurden. Analog hierzu wurde der Einfluss unterschiedlicher Flussraten (5 ml/min und 100 ml/min) bei gleichbleibenden Druckverhältnissen über die Zeit betrachtet. Hierbei zeigte sich, dass bei hohen Druckwerten (>180mmHg) bereits nach 24 Stunden keine Stoffwechselaktivität mehr nachweisbar war, wohingegen bei niedrigen Druckwerten (10mmHg) Vitalität der Gefäßproben bis zu 14 Tagen gegeben war. Entsprechende Ergebnisse zeigte die Perfusion mit hohen und niedrigen Flussraten, bei denen die Gefäßproben nach sieben bis zehn Tagen keine Stoffwechselaktivität mehr aufwiesen (100ml/min), im Gegensatz zu erhaltener Vitalität von Proben bis zu 14 Tagen (5ml/min).

Anhand dieser Vorversuche entstanden zwei Versuchsgruppen, mit denen die molekularbiologischen und histologischen Zielversuche durchgeführt wurden und deren Ergebnisse miteinander verglichen wurden:

- Gruppe A: Perfusion mit venösem physiologischen Druckprofil
- Gruppe B: Perfusion mit arteriellem Druckprofil (Bypass-Bedingungen)

Die Ergebnisse der Vorversuche wurden unter venösen und arteriellen Perfusionsbedingungen an unabhängigen Proben (n=12) nochmals validiert und hierbei zeigte sich, dass unter physiologisch venöser Perfusion eine Lebensfähigkeit der Gefäßproben bis zu 12 Tagen erreicht werden konnte. Demgegenüber konnte unter arteriellen Versuchsbedingungen eine vollständige Vitalität nur maximal etwa fünf Tage nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse stimmen mit MTT-Untersuchungen von Miyakawa et al. überein, die unter venösen Versuchsbedingungen Gefäßproben bis zu vier Tagen lebensfähig halten konnten. Demgegenüber konnten sie unter arterieller Perfusion nur wenige vitale Zellen nach vier Tagen nachweisen (Miyakawa et al., 2008). Ein ähnliches Bild zeigte sich bei Paroz et al. und Gusic et al., welche die Integrität der Gefäße durch histologische und immunhistochemische Methoden bei Perfusion bis zu vierzehn Tagen zeigen konnten (Paroz et al., 2004; Gusic et al., 2005).

4.6 Histologische Untersuchungen

Die operative Venenentnahme und Präparation der Bypassgrafts und die anschließende Implantation in das arterielle Gefäßsystem mit seinen hämodynamischen Veränderungen bezüglich höherer Druck- und Flussbedingungen im Vergleich zur venösen physiologischen Situation führen zur Verletzung des Endothels (Wilson et al., 1997; Soyombo et al., 1993; Hinokiyama et al., 2006). Dieser Schaden der Endothelschicht ist die Voraussetzung für die Aktivierung zahlreicher zellulärer Mechanismen wie der Aktivierung glatter Muskelzellen, die zur Differenzierung, Proliferation und Migration angeregt werden, sowie zum Umbau der extrazellulären Matrix durch Matrix-degradierende Enzyme, was zur Ausbildung der intimalen Hyperplasie und durch diese Prädisposition letztendlich zur Bypassgraft-Stenose führt (Mitra et al., 2006; Tran-Son et al., 2008; Motwani et al., 1998; Davies et al., 1994; Patterson et al., 2001; Schwartz et al., 1997). Die Adaptationsvorgänge der venösen Bypassgrafts an die arteriellen hämodynamischen Bedingungen zeigen ähnliche zelluläre Abläufe wie nach Verletzungen arterieller Gefäße, wobei davon auszugehen ist, dass venöse Gefäße spezifische und unterschiedliche Veränderungen nach Arterialisierung durchlaufen, welche noch nicht vollständig geklärt sind (Muto et al., 2010).

Das neu entwickelte artifizielle Perfusionssystem bietet hierbei die Möglichkeit, histologische Untersuchungen im direkten Vergleich zwischen venös physiologisch und arteriell perfundierten Gefäßen vorzunehmen und potentiell pathologische Um- oder Abbauprozesse der Venenproben aufzuzeigen. Für diesen Zweck wurden von jeder perfundierten Gefäßprobe histologische Schnitte angefertigt. Als Kontrolle diente hierbei ein nicht-perfundiertes Stück der gleichen Venenprobe. Es zeigte sich, dass nach einem Tag Perfusion sowohl unter venösen als auch bei arteriellen Versuchsbedingungen keine histomorphologischen Unterschiede festgestellt werden konnten. Ebenfalls keine Änderungen waren nach drei Tagen unter venösen Bedingungen nachzuweisen. Dem gegenüber zeigte sich unter arteriellen Versuchsbedingungen bereits nach drei Tagen eine sichtbare Zunahme der Gefäßintima. Nach fünf Tagen Perfusion waren in den venösen Gefäßproben nur geringgradige Verdickungen der Intima nachweisbar, während in den arteriell perfundierten Proben deutlich hyperproliferative Bereiche mit intimaler Hyperplasie darstellbar waren. Dies zeigt deutlich, dass unser *ex vivo* Perfusionssystem in der

Lage ist, histologische Unterschiede als Konsequenz eines veränderten Druckprofils darzustellen.

In Übereinstimmung mit unseren Ergebnisse konnten Saucy et al. nach sieben und vierzehn Tagen arterieller Perfusion deutliche Bereiche intimaler Hyperplasie aufzeigen (Saucy et al., 2010). Analog hierzu konnten Patterson et al. nach einer Woche Perfusion unter Hochdruck-Bedingungen eine deutliche Zunahme der Gefäßintima darstellen (Patterson et al., 2001). Ein ähnliches Bild zeigte sich bei Southgate et al., die im Tierversuch mit Implantation venöser Grafts in Karotidenposition nach sieben Tagen eine maximale Ausbildung intimaler Hyperplasie nachweisen konnten (Southgate et al., 1998).

Dem gegenüber konnten Rey et al. zeigen, dass es insbesondere unter venösen Perfusionsbedingungen zu einer Zunahme der intimalen Hyperplasie kam (Rey et al., 2010). Zu ähnlichen Ergebnissen kamen die Gruppen um Morinaga et al. und Porter et al., die eine verstärkte Intimazunahme unter niedrigen Fluss- und Druckbedingungen darstellen konnten (Morinaga et al., 1987; Porter et al., 1996).

Die zum Teil sehr frühe Entwicklung und Entstehung der intimalen Hyperplasie nach drei Tagen arterieller Perfusion könnte durch die Verletzung der Endothelschicht während der Venenentnahme mit anschließender Präparation sowie die veränderten hämodynamischen Bedingungen nach Arterialisierung des Bypassgrafts bedingt sein (Saucy et al., 2010)

Durch diese teilweise gegensätzlichen Ergebnisse sind die verschiedenen Faktoren und Einflüsse hinsichtlich der Druck- und Flussbedingungen auf venöse Bypassgrafts und die damit einhergehende Ausbildung der intimalen Hyperplasie und Bypassgraft-Stenose noch nicht restlos geklärt und bedürfen weiterer Untersuchungen.

4.7 Expression von MMP-2 und den korrespondierenden TIMPs

In der vorliegenden Studie wurde im Anschluss an die Etablierung des artifiziellen Perfusionssystems die Genexpression von MMP-2 und den korrespondierenden TIMPs (tissue inhibitor of metalloproteinases) untersucht. Proteolytische Enzyme wie die Matrixmetalloproteinasen und ihre Inhibitoren (TIMPs) spielen eine zentrale Rolle bei den Ab- und Umbauvorgängen der extrazellulären Matrix sowie bei der Migration von glatten Muskelzellen in die Gefäßintima von vaskulärem Gewebe. Dieses Gefäßremodeling mit Ausbildung von intimaler Hyperplasie und späterer Graft-

Stenose erfolgt im Anschluss an die Implantation venöser Bypassgrafts in den arteriellen Kreislauf im Rahmen von aortokoronaren Bypass-Operationen (Davies et al., 1994; Motwani et al.; 1998; Southgate et al., 1998; Chen et al 1998; Porter et al., 1999; Newby et al 2005). Ausgelöst wird diese Kaskade durch Endothelverletzungen durch die Venenentnahme und die veränderten hämodynamischen Einflüsse auf die Venengrafts im arteriellen System. Über die Aktivierung und Ausschüttung von Wachstumsfaktoren kommt es zur Aktivierung glatter Muskelzellen, welche wiederum für die Bildung und Sekretion von Matrixmetalloproteinasen und einer Zunahme der extrazellulären Matrix verantwortlich sind (Motwani et al., 1998, Galis et al., 1994; Hassantash et al., 2011). Eine wichtige Funktion kommt hierbei der Matrixmetalloproteinase-2 (MMP-2) zu, welche durch Abbau der Basalmembran und weiterer Bestandteile der extrazellulären Matrix die Migration glatter Muskelzellen begünstigt und in der Neointima von Gefäßen und Graft-Stenosen nachgewiesen werden konnte (Loftus et al., 2006; Mavromatis et al., 2000; Whatling et al., 2004; Porter et al., 1998; George et al., 1996). MMP-2 wird als Proenzym synthetisiert und liegt als inaktive Vorstufe an dem Zelloberflächenprotein MT1-MMP (Membran-Typ1-MMP) gebunden vor. Durch Serinproteasen und MT1-MMP wird das Proenzym in seine aktive Form überführt (Spinale, 2002; Ries et al.; 1995). Unspezifische TIMPs, α_2 -Makroglobulin und insbesondere das Verhältnis von MMP-2/TIMP-2 regeln hierbei den Grad der Aktivierung von MMP-2 durch irreversible Bindung von TIMP-2 an den MT1-MMP/MMP-2-Komplex und beeinflussen somit die Um- und Abbauprozesse der extrazellulären Matrix (Visse et al., 2003; Nagase et al., 1999, Murphy et al., 1995). Mit Hilfe des neu entwickelten artifiziellen Perfusionssystems sollten die Einflüsse verschiedener Druck- und Perfusionsprofile auf die Expression und Aktivität von MMP-2 und den korrespondierenden TIMPs in humanen venösen Bypassgefäßen untersucht werden.

4.7.1 MMP-2-Expression und Aktivität

Bei der Expression der MMP-2-mRNA zeigte sich, dass unter venöser Perfusion nur eine leichte Zunahme der Expression über den Perfusionszeitraum von fünf Tagen zu beobachten war. Demgegenüber kam es bei arteriellen Perfusionsbedingungen zu einem signifikanten Anstieg von MMP-2 im Zeitraum von einem bis zu fünf Tagen um das 13-fache ($p=0,001$) im Vergleich zur Kontrolle. Vergleicht man das Verhältnis von arterieller zu venöser Perfusion, so kam es zu einer stetigen und signifikanten Zunahme der Expression von MMP-2 unter arteriellen Bedingungen mit zeitlicher Dauer der Versuche verglichen zu der venösen Situation. Somit konnte eindeutig gezeigt werden, dass durch das arterielle Perfusionsprofil die Expression von MMP-2 auf mRNA-Ebene in Abhängigkeit von der Perfusiondauer von fünf Tagen signifikant induziert wurde (Faktor 5,3; $p=0,03$).

Mittels Zymographie, welche zur Darstellung der proteolytischen Gelatinase-Aktivität der Matrixmetalloproteinasen dient, sollten die Ergebnisse der mRNA-Expression auf Proteinebene durch den Aktivitätsnachweis von MMP-2 bestätigt werden. Wie bereits angeführt wurde, wird MMP-2 als Proenzym synthetisiert, welches in seine aktive Form durch Abspaltung des Propeptids überführt wird. Folglich lassen sich sowohl die inaktive Vorstufe (pro-MMP-2=78kD) als auch die aktive Isoform (akt.-MMP-2=72kD) von MMP-2 in der Zymographie nachweisen.

Unter venösen Perfusionsbedingungen ließ sich vor allem die inaktive Form darstellen. Die Aktivität dieser Isoform war über den zeitlichen Verlauf bei nahezu allen Versuche unter venöser Perfusion konstant. Unter arteriellen Bedingungen wurde vor allem die aktive Form der MMP-2-Expression induziert, welche nach fünf Tagen Perfusion am stärksten nachweisbar war. Beim Vergleich des Verhältnisses von arterieller und venöser Perfusion zeigte sich eine signifikante Zunahme der MMP-2-Aktivität unter arteriellen Perfusionsbedingungen bereits nach drei Tagen (Faktor 1,8-fach; $p=0,003$), welche nach fünf Tagen noch gesteigert war (Faktor 3,5-fach; $p=0,009$). Folglich konnte in Einklang mit der erhöhten Expression von MMP-2 auf mRNA-Ebene auch funktionell eine erhöhte Aktivität von MMP-2 auf Proteinebene nachgewiesen werden.

In Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen konnten Mavromatis et al. und Patterson et al. unter arteriellen Versuchsbedingungen eine erhöhte MMP-2-Neusynthese und Aktivität gegenüber venösen Versuchsbedingungen aufzeigen (Mavromatis et al., 2000; Patterson et al., 2001). Gleiche Resultate lieferten die

Gruppen um Southgate et al., Berceli et al. und Sharony et al., die im Tierversuch mit Kaninchen, Ratten und Hunden nach Implantation von venösen Grafts in das arterielle Gefäßsystem ebenfalls eine Zunahme der MMP-2-Aktivität und der MMP-2-mRNA-Expression mit einem Maximum nach circa einer Woche nachweisen konnten (Southgate et al., 1998; Berceli et al., 2006; Sharony et al., 2006). Unter statischen Versuchsbedingungen in einem organ-culture-model konnten Porter et al. und George et al. analog zur Ausbildung von intimaler Hyperplasie mit zunehmender Versuchsdauer eine verstärkte Aktivität von MMP-2 nachweisen (Porter et al., 1999; George et al., 1997).

4.7.2 TIMP-Expression und Verhältnis des MMP-2/TIMP-2-Komplexes

Wie oben bereits angeführt, können alle TIMPs die Aktivität von MMP-2 regulieren, wobei die größte Affinität zu MMP-2 bei TIMP-2 liegt. Der MMP-2/TIMP-2-Komplex besitzt somit die größte Bindungsspezifität und TIMP-2 hat die stärkste inhibitorische Wirkung auf MMP-2 (Nagase et al., 2006; Kranzhöfer et al., 1999; Denhardt et al., 1993; Kleiner et al., 1993). Daher soll bei der Diskussion der Expressionsergebnisse der TIMPs ein Schwerpunkt auf TIMP-2 und seinen Einfluss auf den MMP-2/TIMP-2-Komplex gelegt werden.

Betrachtet man die Ergebnisse der Genexpression für die venösen Perfusionsbedingungen, so konnte bei TIMP-2 und TIMP-4 kein wesentlicher Unterschied über die Dauer der Perfusion festgestellt werden. Ausschließlich nach drei Tagen Perfusion zeigte sich bei TIMP-2 ein leichter Anstieg der Expressionsrate, der aber im Verlauf wieder abfiel. Lediglich bei TIMP-1 zeigte sich eine stetige Zunahme der Aufregulation über die Perfusionsdauer von zunächst 1,43 (Tag 1) bis zu einem signifikanten Wert von 7,11 (Tag 5; $p=0,04$).

Unter arterieller Perfusion zeigte sich eine erhöhte und signifikante Aufregulation der TIMP-1-Expression, die aber mit steigender Perfusionsdauer keine lineare Zunahme aufwies. Analog zur venösen Situation ließ sich bei TIMP-2 ein Trend zur verstärkten Expression nach drei Tagen Perfusion nachweisen, der aber nicht signifikant war. Dem gegenüber bot TIMP-4 eine stetige Zunahme der Aufregulation der Expressionsrate mit steigender Perfusionsdauer, die nach drei und fünf Tagen signifikante Werte zeigte: 9,79; $p=0,04$ (Tag 3) und 21,82; $p=0,008$ (Tag5).

Betrachtet man das Verhältnis von arterieller zu venöser Perfusion so zeigte sich insbesondere bei TIMP-2 eine verstärkte Aufregulation der Genexpression mit zunehmender Perfusionsdauer unter arteriellen Versuchsbedingungen: 0,68; $p=0,18$ (Tag 1), 2,49; $p=0,44$ (Tag 3), und 3,58; $p=0,05$ (Tag 5).

Vergleicht man die Expression des MMP-2/TIMP-2-Komplexes getrennt für die venöse und arterielle Situation, so zeigte sich unter venöser Perfusion nur eine leichte Aufregulation der Expression. Im Gegensatz dazu kam es unter arteriellen Bedingungen zu einer stetigen Zunahme der Expressionsrate mit steigender Perfusionsdauer im Vergleich zum Kontrollwert, die nach fünf Tagen signifikante Werte zeigte (Faktor 6,02; $p=0,04$).

Die Ergebnisse des Verhältnisses von venöser zu arterieller Perfusion zeigten gleichfalls einen konstanten Zuwachs der Expressionsrate des MMP-2/TIMP-2-Komplexes im arteriellen System. So ergaben sich nach fünf Tagen Perfusion signifikant erhöhte Werte der Genexpression (Faktor 2,04; $p=0,02$).

Folglich konnte gezeigt werden, dass sich das Verhältnis des MMP-2/TIMP-2-Komplexes mit steigender Perfusionsdauer kontinuierlich in Richtung MMP-2-Aufregulation verschiebt und somit die enzymatische Aktivität von MMP-2 gegenüber seinem Inhibitor TIMP-2 überwiegt, was zu vermehrten Ab- und Umbauprozessen der extrazellulären Matrix führt, die wiederum Voraussetzung für die Entstehung intimaler Hyperplasie mit nachfolgender Bypassgraft-Stenose sind.

Analog zur erhöhten Expression und Aktivität von MMP-2 konnten Patterson et al. unter arteriellen Bedingungen eine verstärkte Aktivität von TIMP-1 und TIMP-2 nachweisen und unterstützen somit unsere Ergebnisse (Patterson et al., 2001). Kranzhöfer et al. haben in einem statischen organ-culture-model an humanen Venenproben zur Untersuchung intimaler Hyperplasie gleichfalls eine Aufregulation von TIMP-1 und TIMP-2 sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene aufzeigen können (Kranzhöfer et al., 1999). Des Weiteren konnten sie nachweisen, dass in der Neointima MMP-2 und die korrespondierenden TIMPs in gleichem Maße sezerniert werden, jedoch die Expressions- und Aktivitätsrate von MMP-2 höher war.

Eine mögliche Erklärung hierfür lieferten George et al., die ebenfalls in einem organ-culture-model durch Überexpression von TIMP-2 zeigen konnten, dass die intimale Hyperplasie vor allem durch Inhibierung von MMP-2 auf Proteinebene und nicht durch Hemmung der Transkription von MMP-2 reduziert wurde (George et al., 1998).

Diese Ergebnisse unterstützen unsere Untersuchungen, bei denen wir mit Hilfe des artifiziellen Perfusionssystems nachweisen konnten, dass unter arterieller Perfusion mit zunehmender Zeitdauer und Ausbildung von intimaler Hyperplasie sowohl eine Aufregulation von TIMP-1, TIMP-2 und MMP-2 stattfindet, als auch das Verhältnis von MMP-2/TIMP-2 mehr in Richtung MMP-2-Induktion verschoben wird, was sich durch eine verstärkte Aktivität auf Proteinebene widerspiegelt.

Dem gegenüber konnte Mavromatis et al. weder unter arteriellen noch unter venösen Bedingungen signifikante Unterschiede in der Expression von TIMP-1 und TIMP-2 aufzeigen (Mavromatis et al., 2000). Zu gleichen Ergebnissen kommen Berceli et al. in einem Kaninchenmodell mit Implantation von Venengrafts in Karotidenposition. Sie konnten keine Unterschiede von TIMP-1 und TIMP-2 auf mRNA- und Proteinebene nachweisen, jedoch eine verstärkte MMP-2-Aktivität analog zur Entstehung der Neointima.

Sharony et al. haben im Tierversuch mit Hunden nach Implantation eines Veneninterponats in das arterielle Gefäßsystem eine deutliche Aufregulation von MMP-2 nachweisen können, auf der anderen Seite jedoch divergent zu unseren Ergebnissen eine starke Abregulation von TIMP-2 unter arteriellen Bedingungen gefunden.

Anhand dieser zum Teil gegensätzlichen Ergebnisse sind die verschiedenen Faktoren und Einflüsse, welche für die Sekretion und Aktivierung von MMP-2 und den korrespondierenden TIMPs verantwortlich sind, noch nicht hinreichend geklärt. Insbesondere bedarf es weiterer Untersuchungen zu den hämodynamischen Einflüssen wie Druck, Flussrate und Shear Stress auf das Verhältnis der Gegenspieler MMPs und TIMPs. Somit sind zahlreiche Faktoren, die Einfluss auf venöse Bypassgrafts nach Arterialisierung nehmen und zur Ausbildung der intimalen Hyperplasie und Bypassgraft-Stenose beitragen noch nicht restlos aufgeschlüsselt und bedürfen weiterer Untersuchungen.

4.8 Möglichkeiten und Limitationen des artifiziellen Perfusionssystems

Das von uns entwickelte, etablierte und in ersten Studienversuchen validierte artifizielle Perfusionssystem bietet die Möglichkeit, unter standardisierten und reproduzierbaren Bedingungen Perfusionsversuche sowohl an humanen als auch tierischen Gefäßproben durchzuführen. Durch die individuelle Einstellung der hämodynamischen Fluss- und Druckverhältnisse lassen sich diverse Untersuchungen zur Entstehung arteriosklerotischer Veränderungen in Gefäßproben aber auch Fragestellungen zur Entwicklung intimaler Hyperplasie und Bypassgraft-Stenosen im venösen Gefäßsystem beantworten. Somit können gezielt Studienversuche durchgeführt werden, um die initialen Ereignisse dieser Krankheitsbilder in anschließenden molekularbiologischen Untersuchungen zu quantifizieren. Unser System ermöglicht insbesondere die Berücksichtigung des intakten physiologischen Gewebeverbandes innerhalb eines Gefäßes und die damit einhergehende Gewährleistung von Zell-Zell-Kontakten in der Umgebung der extrazellulären Matrix und gestattet somit den Informationsaustausch zwischen den Zellen. Folglich können nahezu physiologische Bedingungen *ex vivo* dargestellt werden.

Eine wichtige Option besteht darin, Gefäßproben unterschiedlicher Länge und Durchmesser in das System einzubringen und auf die physiologische Gefäßlänge einzustellen. Durch die Verwendung zweier Perfusionssysteme, können mit unserem artifiziellen Perfusionssystem bis zu vier Gefäßproben parallel perfundiert werden. Alternativ kann sowohl ein pulsatile nicht-statischer Fluss als auch ein laminarer Fluss mit einer Frequenz zwischen 1ml/min und 160ml/min gewählt werden. Konstante Druckverhältnisse werden durch individuelle Einstellung an einer Kontroll-Steuereinheit vorgenommen, die mit einer Perfusorpumpe verbunden ist, welche den gewünschten Zieldruck aufrechterhält. Das kleine Volumen (12ml) des Kreislaufs ermöglicht die definierte Zugabe von Substanzen und Stimulantien in gewünschten Konzentrationen unter Berücksichtigung ökonomischer Aspekte wie Stoffmenge und Kosten.

Das artifizielle Perfusionssystem bietet damit die Möglichkeit, einzelne molekularbiologische Parameter unter gewünschten hämodynamischen Bedingungen zu untersuchen oder gezielt einzelne Variablen durch Zugabe von Substanzen zu beeinflussen.

Unser Perfusionssystem ist durch die Verwendung von Zellkulturmedium als Perfusionsmedium wie alle derartigen Systeme dahingehend begrenzt, dass durch die Abwesenheit von autologem Blut und seinen rheologischen Bestandteilen wie Blutzellen, Blutplättchen, Gerinnungs- und Entzündungsmediatoren und insbesondere auch der Interaktionen zwischen diesen Blutbestandteilen und dem Endothel des Gefäßes wichtige physiologische Komponenten fehlen. Insbesondere aktivierte Gerinnungsfaktoren und Entzündungsmediatoren im Zusammenspiel mit dem Gefäßendothel spielen bei der Entwicklung arteriosklerotischer und intimaler Gefäßveränderungen eine entscheidende Rolle.

Aufgrund der Verwendung einer Rollerpumpe zur Erzeugung eines arteriellen pulsatilem Flussprofils ist die Verwendung von Frischblut nicht möglich, da es durch die Rollerpumpe zur Aktivierung des Gerinnungssystems und zur Zerstörung der Blutplättchen kommt. Mittels einer Zentrifugalpumpe könnte die Hämolyse zwar deutlich minimiert werden, jedoch ist diese Pumpe nicht in der Lage ein arterielles pulsatilem Flussprofil zu generieren.

Auf der anderen Seite würden durch die Verwendung von physiologischem autologen Blut zahlreiche weitere Variablen Einfluss nehmen und die Interpretation von Ergebnissen erschweren.

Eine weitere Limitation unseres Systems ist die zeitlich begrenzte Möglichkeit, Gefäßproben lebensfähig zu halten, da durch das fehlende Blut wichtige Nährstoffe, sowie endokrine und humorale Faktoren fehlen. Allerdings müsste für eine längerfristige Perfusion mit autologen Blut regelmäßig ein Austausch stattfinden, um toxische Stoffwechselmetaboliten und Entzündungsmediatoren zu entfernen.

Abgesehen von diesen Einschränkungen bietet das artifizielle Perfusionssystem zahlreiche Möglichkeiten zum besseren Verständnis der Arterioskleroseentstehung und der Entwicklung von Bypassgraft-Stenosen.

4.9 Ausblick

Um der Komplexität der Ab- und Umbauvorgänge und der Rolle der Matrixmetalloproteinasen (MMPs) in Zusammenhang mit der Entstehung und Entwicklung intimaler Hyperplasie und nachfolgender Bypassgraft-Stenosen gerecht zu werden, müssen zusätzliche Untersuchungen der endogenen Inhibitoren (TIMPs) durchgeführt werden. Insbesondere die Aktivität der TIMPs auf Proteinebene kann hierbei neue Aufschlüsse über die Regulation der Matrixmetalloproteinasen liefern.

Des Weiteren sollte eine weitere Optimierung des artifiziellen Perfusionssystems dahingehend erfolgen, die Gefäßproben länger lebensfähig zu halten. Ein möglicher Ansatz wäre eventuell, dem Perfusionsmedium Dextran oder andere Nährstoffe zuzugeben. Ausserdem könnte man sich vorstellen, die Aktivität von MMP-2 durch die definierte Zugabe von spezifischen Antagonisten zumindest stark zu reduzieren.

Um die Entstehung der intimalen Hyperplasie zu unterdrücken oder nach Ausbildung zu reduzieren käme eine Zugabe von Antioxidantien oder anti-apoptotischer und anti-inflammatorischer Substanzen in den Kreislauf in Betracht. Potentielle Zielgene könnten durch vergleichende genomweite Expressionsstudien der Gefäße nach Perfusion mit unterschiedlichen Druckprofilen identifiziert werden.

Folglich bietet das artifizielle Perfusionssystem eine Vielzahl an Möglichkeiten, um weitere Untersuchungen auf dem Feld der Arteriosklerose- und Gefäßforschung durchzuführen.

5 Zusammenfassung

In den westlichen Industrienationen zählt die arteriosklerotisch bedingte koronare Herzerkrankung zu den führenden Todesursachen. Neben interventionellen Verfahren stellt die aortokoronare Bypasschirurgie die wichtigste Therapiesäule dar. Hierbei kommen insbesondere venöse Bypassgrafts unter Verwendung der Vena saphena magna bei Mehrgefäßerkrankungen zum Einsatz. Trotz weitreichender Fortschritte und Optimierung der operativen Rekonstruktionsverfahren und medikamentöser Therapiestrategien konnte die Langzeitprognose venöser Bypassgrafts nicht wesentlich verbessert werden. So zeigen 25 % der venösen Bypässe nach einem Jahr bereits signifikante Stenosen und nach 10 Jahren sind 50 % der Grafts okkludiert und multipel stenosiert. Ursächlich für diese Venengraft-Okklusion sind verschiedene Pathomechanismen, die als Folge der Implantation venöser Bypassgrafts in das arterielle Gefäßsystem ablaufen. So wird durch die Entnahme und Präparation des Venengrafts intraoperativ das Gefäßendothel geschädigt. Dieser Vorgang wird durch die Arterialisierung und den damit einhergehenden veränderten hämodynamischen Einflüssen auf das Gefäß noch beschleunigt. Als Folge der Endothelschädigung kommt es zur Plättchenadhäsion- und -aggregation. Diese sezernieren zahlreiche bioaktive Substanzen wie Wachstumsfaktoren, Entzündungsmediatoren und Zytokine, die zur Stimulation glatter Muskelzellen in der Gefäßmedia führen. Durch Umwandlung dieser Muskelzellen von einem kontraktilen in einen synthetischen Phänotyp wird vermehrt extrazelluläre Matrix gebildet und Matrix-degradierende Enzyme wie Matrixmetalloproteinasen werden sezerniert. Es kommt zu einem verstärktem Ab- und Umbau der Gefäßarchitektur und durch Migration glatter Muskelzellen in die Intima zur Ausbildung intimaler Hyperplasie. Durch Einwanderung in die Gefäßintima und Differenzierung adventitieller Fibroblasten zu Myofibroblasten kommt es im weiteren Verlauf zu einer immer größeren Einengung des Gefäßlumens bis hin zur vollständigen Okklusion.

Um die Pathomechanismen und molekularbiologischen Parameter, die zu dieser Umstrukturierung und dem Remodeling des Bypassgrafts nach Einbringung in das arterielle Gefäßsystem und damit einhergehend zur Ausbildung einer vorzeitigen Venengraftokklusion führen, besser verstehen zu können, haben wir ein artifizielles Perfusionssystem entwickelt, welches *ex vivo* die Perfusion von venösen

Bypassgrafts unter standardisierten und reproduzierbaren Bedingungen ermöglicht. Insbesondere die Berücksichtigung hämodynamischer Einflüsse wie Druck und Flussrate auf die Gefäßproben unter arteriellen Bedingungen im Vergleich zur venösen physiologischen Situation standen hierbei im Vordergrund des Interesses. Neben Vitalitätstests der Gefäße und histologischen Untersuchungen zum Nachweis der Entstehung von intimaler Hyperplasie wurden als molekularbiologische Parameter die am Remodeling beteiligte Matrixmetalloproteinase-2 (MMP-2) und seine endogenen Inhibitoren TIMPs (tissue inhibitor of metalloproteinases) auf Genexpressions- und Proteinebene untersucht. Für die Studienversuche wurden nichtvariköse Venengrafts von insgesamt 35 Patienten (Durchschnittsalter $73,77 \pm 6,03$ Jahre; 9 weiblich, 26 männlich) verwendet. Durch einen MTT-Vitalitätstest konnten wir zeigen, dass die humanen Venenproben bis zu fünf Tagen unter arteriellen Bedingungen und bis zu 12 Tagen unter venösen Perfusionsbedingungen im artifiziiellen Perfusionssystem lebensfähig sind. Bei den histologischen Untersuchungen zeigte sich nach drei Tagen arterieller Perfusion eine sichtbare Zunahme der Gefäßintima und nach fünf Tagen waren deutlich hyperproliferative Bereiche mit intimaler Hyperplasie im Vergleich zur Kontrolle darstellbar. Demgegenüber waren bei venösen Perfusionsverhältnissen nur geringgradige Veränderungen der Intima nachweisbar.

Bei den molekularbiologischen Untersuchungen zur Genexpression konnten wir im Vergleich der arteriellen Versuchsgruppe zum venösen Kollektiv eine signifikante Aufregulation der mRNA von MMP-2 und TIMP-2 mit steigender Perfusionsdauer nachweisen. Das Verhältnis von MMP-2 zu TIMP-2 zeigte gleichfalls einen konstanten Zuwachs der Expressionsrate des MMP-2/TIMP-2-Komplexes im arteriellen System. Das Verhältnis des MMP-2/TIMP-2-Komplexes war mit steigender Perfusionsdauer weiter in Richtung MMP-2-Aufregulation verschoben, wodurch die enzymatische Aktivität von MMP-2 gegenüber seinem Inhibitor TIMP-2 überwog. Diese Ergebnisse konnten wir auf Proteinebene bestätigen. Hierbei zeigte sich, dass unter arteriellen Perfusionsbedingungen eine signifikante Zunahme der Gesamtaktivität von MMP-2 und der aktiven Isoform von MMP-2 gegenüber der venösen Situation erfolgte.

Mit Hilfe des neu entwickelten artifiziiellen Perfusionssystems sind wir in der Lage, unter standardisierten und reproduzierbaren Versuchsbedingungen hämodynamische Einflüsse *ex vivo* auf Gefäßproben zu untersuchen. In ersten

Studienversuchen an humanen venösen Bypassgrafts konnten wir hierbei zeigen, dass es im Vergleich zur physiologischen venösen Situation unter arteriellen Versuchsbedingungen zu histologischen Veränderungen im Sinne von intimaler Hyperplasie und zur Aufregulation von Genen kommt, die an der Entstehung von Bypassgraft-Stenosen beteiligt sind.

6 Literaturverzeichnis

- 1 E. Allaire, and A. W. Clowes, 'Endothelial Cell Injury in Cardiovascular Surgery: The Intimal Hyperplastic Response', *Ann Thorac Surg*, 63 (1997), 582-91.
- 2 K. E. Allen, K. Varty, L. Jones, R. D. Sayers, P. R. Bell, and N. J. London, 'Human Venous Endothelium Can Promote Intimal Hyperplasia in a Paracrine Manner', *J Vasc Surg*, 19 (1994), 577-84.
- 3 S. Ander, M. MacLennan, S. Bentil, B. Leavitt, and N. Chesler, 'Pressure-Induced Vector Transport in Human Saphenous Vein', *Ann Biomed Eng*, 33 (2005), 202-8.
- 4 M. P. Anstadt, D. L. Franga, V. Portik-Dobos, A. Pennathur, M. Bannan, K. Mawulawde, and A. Ergul, 'Native Matrix Metalloproteinase Characteristics May Influence Early Stenosis of Venous Versus Arterial Coronary Artery Bypass Grafting Conduits', *Chest*, 125 (2004), 1853-8.
- 5 P. Basu, U. Sen, N. Tyagi, and S. C. Tyagi, 'Blood Flow Interplays with Elastin: Collagen and Mmp: Timp Ratios to Maintain Healthy Vascular Structure and Function', *Vasc Health Risk Manag*, 6 (2010), 215-28.
- 6 M. P. Bendeck, N. Zempo, A. W. Clowes, R. E. Galardy, and M. A. Reidy, 'Smooth Muscle Cell Migration and Matrix Metalloproteinase Expression after Arterial Injury in the Rat', *Circ Res*, 75 (1994), 539-45.
- 7 S. A. Berceli, H. S. Borovetz, R. A. Sheppeck, H. H. Moosa, V. S. Warty, M. A. Armany, and I. M. Herman, 'Mechanisms of Vein Graft Atherosclerosis: Ldl Metabolism and Endothelial Actin Reorganization', *J Vasc Surg*, 13 (1991), 336-47.
- 8 S. A. Berceli, Z. Jiang, N. V. Klingman, C. L. Pfahnl, Z. S. Abouhamze, C. D. Frase, G. S. Schultz, and C. K. Ozaki, 'Differential Expression and Activity of Matrix Metalloproteinases During Flow-Modulated Vein Graft Remodeling', *J Vasc Surg*, 39 (2004), 1084-90.
- 9 S. A. Berceli, Z. Jiang, N. V. Klingman, G. S. Schultz, and C. K. Ozaki, 'Early Differential Mmp-2 and -9 Dynamics During Flow-Induced Arterial and Vein Graft Adaptations', *J Surg Res*, 134 (2006), 327-34.
- 10 H. Birkedal-Hansen, W. G. Moore, M. K. Bodden, L. J. Windsor, B. Birkedal-Hansen, A. DeCarlo, and J. A. Engler, 'Matrix Metalloproteinases: A Review', *Crit Rev Oral Biol Med*, 4 (1993), 197-250.
- 11 M. G. Bourassa, J. Lesperance, C. Eastwood, L. Schwartz, G. Cote, F. Kazim, and G. Hudon, 'Clinical, Physiologic, Anatomic and Procedural Factors Predictive of Restenosis after Percutaneous Transluminal Coronary Angioplasty', *J Am Coll Cardiol*, 18 (1991), 368-76.
- 12 D. M. Bravata, A. L. Gienger, K. M. McDonald, V. Sundaram, M. V. Perez, R. Varghese, J. R. Kapoor, R. Ardehali, D. K. Owens, and M. A. Hlatky, 'Systematic Review: The Comparative Effectiveness of Percutaneous Coronary Interventions and Coronary Artery Bypass Graft Surgery', *Ann Intern Med*, 147 (2007), 703-16.
- 13 B. H. Bulkley, and G. M. Hutchins, 'Accelerated "Atherosclerosis". A Morphologic Study of 97 Saphenous Vein Coronary Artery Bypass Grafts', *Circulation*, 55 (1977), 163-9.

- 14 L. Campeau, M. Enjalbert, J. Lesperance, M. G. Bourassa, P. Kwiterovich, Jr., S. Wacholder, and A. Sniderman, 'The Relation of Risk Factors to the Development of Atherosclerosis in Saphenous-Vein Bypass Grafts and the Progression of Disease in the Native Circulation. A Study 10 Years after Aortocoronary Bypass Surgery', *N Engl J Med*, 311 (1984), 1329-32.
- 15 A. Carpentier, J. L. Guermontprez, A. Deloche, C. Frechette, and C. DuBost, 'The Aorta-to-Coronary Radial Artery Bypass Graft. A Technique Avoiding Pathological Changes in Grafts', *Ann Thorac Surg*, 16 (1973), 111-21.
- 16 T. E. Cawston, and E. Mercer, 'Preferential Binding of Collagenase to Alpha 2-Macroglobulin in the Presence of the Tissue Inhibitor of Metalloproteinases', *FEBS Lett*, 209 (1986), 9-12.
- 17 F. Chen, P. Eriksson, G. K. Hansson, I. Herzfeld, M. Klein, L. O. Hansson, and G. Valen, 'Expression of Matrix Metalloproteinase 9 and Its Regulators in the Unstable Coronary Atherosclerotic Plaque', *Int J Mol Med*, 15 (2005), 57-65.
- 18 Y. Chen, R. J. Kelm, Jr., R. C. Budd, B. E. Sobel, and D. J. Schneider, 'Inhibition of Apoptosis and Caspase-3 in Vascular Smooth Muscle Cells by Plasminogen Activator Inhibitor Type-1', *J Cell Biochem*, 92 (2004), 178-88.
- 19 V. Clerin, R. J. Gusic, J. O'Brien, P. M. Kirshbom, R. J. Myung, J. W. Gaynor, and K. J. Gooch, 'Mechanical Environment, Donor Age, and Presence of Endothelium Interact to Modulate Porcine Artery Viability Ex Vivo', *Ann Biomed Eng*, 30 (2002), 1117-27.
- 20 B. S. Conklin, S. M. Surowiec, P. H. Lin, and C. Chen, 'A Simple Physiologic Pulsatile Perfusion System for the Study of Intact Vascular Tissue', *Med Eng Phys*, 22 (2000), 441-9.
- 21 J. L. Cox, D. A. Chiasson, and A. I. Gotlieb, 'Stranger in a Strange Land: The Pathogenesis of Saphenous Vein Graft Stenosis with Emphasis on Structural and Functional Differences between Veins and Arteries', *Prog Cardiovasc Dis*, 34 (1991), 45-68.
- 22 H. C. Crawford, and L. M. Matrisian, 'Mechanisms Controlling the Transcription of Matrix Metalloproteinase Genes in Normal and Neoplastic Cells', *Enzyme Protein*, 49 (1996), 20-37.
- 23 K. S. Cunningham, and A. I. Gotlieb, 'The Role of Shear Stress in the Pathogenesis of Atherosclerosis', *Lab Invest*, 85 (2005), 9-23.
- 24 M. G. Davies, and P. O. Hagen, 'Structural and Functional Consequences of Bypass Grafting with Autologous Vein', *Cryobiology*, 31 (1994), 63-70.
- 25 P. F. Davies, 'Hemodynamic Shear Stress and the Endothelium in Cardiovascular Pathophysiology', *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*, 6 (2009), 16-26.
- 26 D. T. Denhardt, B. Feng, D. R. Edwards, E. T. Cocuzzi, and U. M. Malyankar, 'Tissue Inhibitor of Metalloproteinases (Timp, Aka Epa): Structure, Control of Expression and Biological Functions', *Pharmacol Ther*, 59 (1993), 329-41.

- 27 H. Dietrich, Y. Hu, Y. Zou, U. Huemer, B. Metzler, C. Li, M. Mayr, and Q. Xu, 'Rapid Development of Vein Graft Atheroma in Apoe-Deficient Mice', *Am J Pathol*, 157 (2000), 659-69.
- 28 C. M. Dollery, J. R. McEwan, and A. M. Henney, 'Matrix Metalloproteinases and Cardiovascular Disease', *Circ Res*, 77 (1995), 863-8.
- 29 D. R. Edwards, P. P. Beaudry, T. D. Laing, V. Kowal, K. J. Leco, P. A. Leco, and M. S. Lim, 'The Roles of Tissue Inhibitors of Metalloproteinases in Tissue Remodelling and Cell Growth', *Int J Obes Relat Metab Disord*, 20 Suppl 3 (1996), S9-15.
- 30 R. G. Favaloro, 'Saphenous Vein Autograft Replacement of Severe Segmental Coronary Artery Occlusion: Operative Technique', *Ann Thorac Surg*, 5 (1968), 334-9.
- 31 R. G. Favaloro, D. B. Effler, C. Cheanvechai, R. A. Quint, and F. M. Sones, Jr., 'Acute Coronary Insufficiency (Impending Myocardial Infarction and Myocardial Infarction): Surgical Treatment by the Saphenous Vein Graft Technique', *Am J Cardiol*, 28 (1971), 598-607.
- 32 R. G. Favaloro, D. B. Effler, L. K. Groves, W. C. Sheldon, and M. Riahi, 'Direct Myocardial Revascularization with Saphenous Vein Autograft: Clinical Experience in 100 Cases. 1969', *Chest*, 136 (2009), e26-7.
- 33 G. M. Fitzgibbon, H. P. Kafka, A. J. Leach, W. J. Keon, G. D. Hooper, and J. R. Burton, 'Coronary Bypass Graft Fate and Patient Outcome: Angiographic Follow-up of 5,065 Grafts Related to Survival and Reoperation in 1,388 Patients During 25 Years', *J Am Coll Cardiol*, 28 (1996), 616-26.
- 34 Z. S. Galis, 'Vulnerable Plaque: The Devil Is in the Details', *Circulation*, 110 (2004), 244-6.
- 35 Z. S. Galis, G. K. Sukhova, M. W. Lark, and P. Libby, 'Increased Expression of Matrix Metalloproteinases and Matrix Degrading Activity in Vulnerable Regions of Human Atherosclerotic Plaques', *J Clin Invest*, 94 (1994), 2493-503.
- 36 S. J. George, 'Tissue Inhibitors of Metalloproteinases and Metalloproteinases in Atherosclerosis', *Curr Opin Lipidol*, 9 (1998), 413-23.
- 37 S. J. George, A. B. Zaltsman, and A. C. Newby, 'Surgical Preparative Injury and Neointima Formation Increase Mmp-9 Expression and Mmp-2 Activation in Human Saphenous Vein', *Cardiovasc Res*, 33 (1997), 447-59.
- 38 J. Golledge, R. J. Turner, S. L. Harley, D. R. Springall, and J. T. Powell, 'Development of an in Vitro Model to Study the Response of Saphenous Vein Endothelium to Pulsatile Arterial Flow and Circumferential Deformation', *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 13 (1997), 605-12.
- 39 D. E. Gomez, D. F. Alonso, H. Yoshiji, and U. P. Thorgeirsson, 'Tissue Inhibitors of Metalloproteinases: Structure, Regulation and Biological Functions', *Eur J Cell Biol*, 74 (1997), 111-22.
- 40 R. J. Gusic, R. Myung, M. Petko, J. W. Gaynor, and K. J. Gooch, 'Shear Stress and Pressure Modulate Saphenous Vein Remodeling Ex Vivo', *J Biomech*, 38 (2005), 1760-9.

- 41 C. Hahn, and M. A. Schwartz, 'Mechanotransduction in Vascular Physiology and Atherogenesis', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10 (2009), 53-62.
- 42 S. Hamacher, S. Matern, and E. Roeb, '[Extracellular Matrix -- from Basic Research to Clinical Significance. An Overview with Special Consideration of Matrix Metalloproteinases]', *Dtsch Med Wochenschr*, 129 (2004), 1976-80.
- 43 E. L. Hannan, M. J. Racz, G. Walford, R. H. Jones, T. J. Ryan, E. Bennett, A. T. Culliford, O. W. Isom, J. P. Gold, and E. A. Rose, 'Long-Term Outcomes of Coronary-Artery Bypass Grafting Versus Stent Implantation', *N Engl J Med*, 352 (2005), 2174-83.
- 44 S. A. Hassantash, B. Bikdeli, S. Kalantarian, M. Sadeghian, and H. Afshar, 'Pathophysiology of Aortocoronary Saphenous Vein Bypass Graft Disease', *Asian Cardiovasc Thorac Ann*, 16 (2008), 331-6.
- 45 K. Hinokiyama, G. Valen, S. Tokuno, J. B. Vedin, and J. Vaage, 'Vein Graft Harvesting Induces Inflammation and Impairs Vessel Reactivity', *Ann Thorac Surg*, 82 (2006), 1458-64.
- 46 S. Ishiwata, T. Tukada, S. Nakanishi, S. Nishiyama, and A. Seki, 'Postangioplasty Restenosis: Platelet Activation and the Coagulation-Fibrinolysis System as Possible Factors in the Pathogenesis of Restenosis', *Am Heart J*, 133 (1997), 387-92.
- 47 B. Joddar, R. K. Reen, M. S. Firstenberg, S. Varadharaj, J. M. McCord, J. L. Zweier, and K. J. Gooch, 'Protandim Attenuates Intimal Hyperplasia in Human Saphenous Veins Cultured Ex Vivo Via a Catalase-Dependent Pathway', *Free Radic Biol Med*, 50 (2011), 700-9.
- 48 J. L. Johnson, G. J. van Eys, G. D. Angelini, and S. J. George, 'Injury Induces Dedifferentiation of Smooth Muscle Cells and Increased Matrix-Degrading Metalloproteinase Activity in Human Saphenous Vein', *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 21 (2001), 1146-51.
- 49 D. E. Kleiner, Jr., A. Tuuttila, K. Tryggvason, and W. G. Stetler-Stevenson, 'Stability Analysis of Latent and Active 72-Kda Type Iv Collagenase: The Role of Tissue Inhibitor of Metalloproteinases-2 (Timp-2)', *Biochemistry*, 32 (1993), 1583-92.
- 50 V. I. Kolesov, and L. V. Potashov, '[Surgery of Coronary Arteries]', *Eksp Khir Anesteziol*, 10 (1965), 3-8.
- 51 A. Kranzhofer, A. H. Baker, S. J. George, and A. C. Newby, 'Expression of Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1, -2, and -3 During Neointima Formation in Organ Cultures of Human Saphenous Vein', *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 19 (1999), 255-65.
- 52 R. F. Labadie, J. F. Antaki, J. L. Williams, S. Katyal, J. Ligush, S. C. Watkins, S. M. Pham, and H. S. Borovetz, 'Pulsatile Perfusion System for Ex Vivo Investigation of Biochemical Pathways in Intact Vascular Tissue', *Am J Physiol*, 270 (1996), H760-8.
- 53 M. W. Li, M. O. Mian, T. Barhoumi, A. Rehman, K. Mann, P. Paradis, and E. L. Schiffrin, 'Endothelin-1 Overexpression Exacerbates Atherosclerosis and Induces Aortic Aneurysms in Apolipoprotein E Knockout Mice', *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 33 (2013), 2306-15.

- 54 I. M. Loftus, and M. M. Thompson, 'The Role of Matrix Metalloproteinases in Vascular Disease', *Vasc Med*, 7 (2002), 117-33.
- 55 A. M. Malek, S. L. Alper, and S. Izumo, 'Hemodynamic Shear Stress and Its Role in Atherosclerosis', *JAMA*, 282 (1999), 2035-42.
- 56 D. L. Mann, and F. G. Spinale, 'Activation of Matrix Metalloproteinases in the Failing Human Heart: Breaking the Tie That Binds', *Circulation*, 98 (1998), 1699-702.
- 57 I. Masood, K. E. Porter, and N. J. London, 'Endothelin-1 Is a Mediator of Intimal Hyperplasia in Organ Culture of Human Saphenous Vein', *Br J Surg*, 84 (1997), 499-503.
- 58 K. Mavromatis, T. Fukai, M. Tate, N. Chesler, D. N. Ku, and Z. S. Galis, 'Early Effects of Arterial Hemodynamic Conditions on Human Saphenous Veins Perfused Ex Vivo', *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 20 (2000), 1889-95.
- 59 D. Mehta, M. B. Izzat, A. J. Bryan, and G. D. Angelini, 'Towards the Prevention of Vein Graft Failure', *Int J Cardiol*, 62 Suppl 1 (1997), S55-63.
- 60 R. H. Mehta, T. B. Ferguson, R. D. Lopes, G. E. Hafley, M. J. Mack, N. T. Kouchoukos, C. M. Gibson, R. A. Harrington, R. M. Califf, E. D. Peterson, J. H. Alexander, and I. V. Investigators Project of Ex-vivo Vein Graft Engineering via Transfection, 'Saphenous Vein Grafts with Multiple Versus Single Distal Targets in Patients Undergoing Coronary Artery Bypass Surgery: One-Year Graft Failure and Five-Year Outcomes from the Project of Ex-Vivo Vein Graft Engineering Via Transfection (Prevent) Iv Trial', *Circulation*, 124 (2011), 280-8.
- 61 A. K. Mitra, D. M. Gangahar, and D. K. Agrawal, 'Cellular, Molecular and Immunological Mechanisms in the Pathophysiology of Vein Graft Intimal Hyperplasia', *Immunol Cell Biol*, 84 (2006), 115-24.
- 62 A. K. Mitra, G. Jia, D. M. Gangahar, and D. K. Agrawal, 'Temporal Pten Inactivation Causes Proliferation of Saphenous Vein Smooth Muscle Cells of Human Cabg Conduits', *J Cell Mol Med*, 13 (2009), 177-87.
- 63 A. A. Miyakawa, L. A. Dallan, S. Lacchini, T. F. Borin, and J. E. Krieger, 'Human Saphenous Vein Organ Culture under Controlled Hemodynamic Conditions', *Clinics (Sao Paulo)*, 63 (2008), 683-8.
- 64 J. G. Motwani, and E. J. Topol, 'Aortocoronary Saphenous Vein Graft Disease: Pathogenesis, Predisposition, and Prevention', *Circulation*, 97 (1998), 916-31.
- 65 S. C. Muluk, D. A. Vorp, D. A. Severyn, S. Gleixner, P. C. Johnson, and M. W. Webster, 'Enhancement of Tissue Factor Expression by Vein Segments Exposed to Coronary Arterial Hemodynamics', *J Vasc Surg*, 27 (1998), 521-7.
- 66 G. J. Murphy, and G. D. Angelini, 'Insights into the Pathogenesis of Vein Graft Disease: Lessons from Intravascular Ultrasound', *Cardiovasc Ultrasound*, 2 (2004), 8.
- 67 G. Murphy, and F. Willenbrock, 'Tissue Inhibitors of Matrix Metalloendopeptidases', *Methods Enzymol*, 248 (1995), 496-510.

- 68 A. Muto, L. Model, K. Ziegler, S. D. Eghbalieh, and A. Dardik, 'Mechanisms of Vein Graft Adaptation to the Arterial Circulation: Insights into the Neointimal Algorithm and Management Strategies', *Circ J*, 74 (2010), 1501-12.
- 69 H. Nagase, R. Visse, and G. Murphy, 'Structure and Function of Matrix Metalloproteinases and Timp's', *Cardiovasc Res*, 69 (2006), 562-73.
- 70 H. Nagase, and J. F. Woessner, Jr., 'Matrix Metalloproteinases', *J Biol Chem*, 274 (1999), 21491-4.
- 71 A. C. Newby, 'Dual Role of Matrix Metalloproteinases (Matrixins) in Intimal Thickening and Atherosclerotic Plaque Rupture', *Physiol Rev*, 85 (2005), 1-31.
- 72 A. C. Newby, 'Matrix Metalloproteinases Regulate Migration, Proliferation, and Death of Vascular Smooth Muscle Cells by Degrading Matrix and Non-Matrix Substrates', *Cardiovasc Res*, 69 (2006), 614-24.
- 73 J. W. Nichol, M. Petko, R. J. Myung, J. W. Gaynor, and K. J. Gooch, 'Hemodynamic Conditions Alter Axial and Circumferential Remodeling of Arteries Engineered Ex Vivo', *Ann Biomed Eng*, 33 (2005), 721-32.
- 74 A. Papazafiropoulou, and N. Tentolouris, 'Matrix Metalloproteinases and Cardiovascular Diseases', *Hippokratia*, 13 (2009), 76-82.
- 75 A. Paroz, H. Probst, F. Saucy, L. Mazzolai, E. Rizzo, H. B. Ris, and J. M. Corpataux, 'Comparison of Morphological and Functional Alterations of Human Saphenous Veins after Seven and Fourteen Days of Ex Vivo Perfusion', *Eur Surg Res*, 36 (2004), 274-81.
- 76 M. A. Patterson, C. D. Leville, C. D. Hower, J. M. Jean-Claude, G. R. Seabrook, J. B. Towne, and R. A. Cambria, 'Shear Force Regulates Matrix Metalloproteinase Activity in Human Saphenous Vein Organ Culture', *J Surg Res*, 95 (2001), 67-72.
- 77 S. Peykar, D. J. Angiolillo, T. A. Bass, and M. A. Costa, 'Saphenous Vein Graft Disease', *Minerva Cardioangiol*, 52 (2004), 379-90.
- 78 K. E. Porter, S. Nydahl, P. Dunlop, K. Varty, A. J. Thrush, and N. J. London, 'The Development of an in Vitro Flow Model of Human Saphenous Vein Graft Intimal Hyperplasia', *Cardiovasc Res*, 31 (1996), 607-14.
- 79 K. E. Porter, D. H. Olojugba, I. Masood, M. Pemberton, P. R. Bell, and N. J. London, 'Endothelin-B Receptors Mediate Intimal Hyperplasia in an Organ Culture of Human Saphenous Vein', *J Vasc Surg*, 28 (1998), 695-701.
- 80 K. E. Porter, M. M. Thompson, I. M. Loftus, E. McDermott, L. Jones, M. Crowther, P. R. Bell, and N. J. London, 'Production and Inhibition of the Gelatinolytic Matrix Metalloproteinases in a Human Model of Vein Graft Stenosis', *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 17 (1999), 404-12.
- 81 J. D. Raffetto, and R. A. Khalil, 'Matrix Metalloproteinases and Their Inhibitors in Vascular Remodeling and Vascular Disease', *Biochem Pharmacol*, 75 (2008), 346-59.

- 82 N. B. Ratliff, and J. L. Myles, 'Rapidly Progressive Atherosclerosis in Aortocoronary Saphenous Vein Grafts. Possible Immune-Mediated Disease', *Arch Pathol Lab Med*, 113 (1989), 772-6.
- 83 J. Rey, H. Probst, L. Mazzolai, F. T. Bosman, M. Pusztaszeri, N. Stergiopoulos, H. B. Ris, D. Hayoz, F. Saucy, and J. M. Corpataux, 'Comparative Assessment of Intimal Hyperplasia Development after 14 Days in Two Different Experimental Settings: Tissue Culture Versus Ex Vivo Continuous Perfusion of Human Saphenous Vein', *J Surg Res*, 121 (2004), 42-9.
- 84 C. Ries, and P. E. Petrides, 'Cytokine Regulation of Matrix Metalloproteinase Activity and Its Regulatory Dysfunction in Disease', *Biol Chem Hoppe Seyler*, 376 (1995), 345-55.
- 85 N. Roubos, F. L. Rosenfeldt, S. M. Richards, R. A. Conyers, and B. B. Davis, 'Improved Preservation of Saphenous Vein Grafts by the Use of Glycerol Trinitrate-Verapamil Solution During Harvesting', *Circulation*, 92 (1995), 1131-6.
- 86 F. Saucy, H. Probst, F. Alonso, X. Berard, S. Deglise, S. Dunoyer-Geindre, L. Mazzolai, E. Kruithof, J. A. Haefliger, and J. M. Corpataux, 'Ex Vivo Pulsatile Perfusion of Human Saphenous Veins Induces Intimal Hyperplasia and Increased Levels of the Plasminogen Activator Inhibitor 1', *Eur Surg Res*, 45 (2010), 50-9.
- 87 L. B. Schwartz, C. M. Purut, M. F. Massey, J. C. Pence, P. K. Smith, and R. L. McCann, 'Effects of Pulsatile Perfusion on Human Saphenous Vein Vasoreactivity: A Preliminary Report', *Cardiovasc Surg*, 4 (1996), 143-9.
- 88 S. M. Schwartz, H. T. Schwartz, S. Horvath, E. Schadt, and S. I. Lee, 'A Systematic Approach to Multifactorial Cardiovascular Disease: Causal Analysis', *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 32 (2012), 2821-35.
- 89 P. K. Shah, 'Mechanisms of Plaque Vulnerability and Rupture', *J Am Coll Cardiol*, 41 (2003), 15S-22S.
- 90 R. Sharony, G. Pintucci, P. C. Saunders, E. A. Grossi, F. G. Baumann, A. C. Galloway, and P. Mignatti, 'Matrix Metalloproteinase Expression in Vein Grafts: Role of Inflammatory Mediators and Extracellular Signal-Regulated Kinases-1 and -2', *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 290 (2006), H1651-9.
- 91 B. C. Solymoss, M. G. Bourassa, M. Marcil, S. Levesque, S. Varga, and L. Campeau, 'Long-Term Rates of Cardiovascular Events in Patients with the Metabolic Syndrome According to Severity of Coronary-Angiographic Alterations', *Coron Artery Dis*, 20 (2009), 1-8.
- 92 K. M. Southgate, M. Davies, R. F. Booth, and A. C. Newby, 'Involvement of Extracellular-Matrix-Degrading Metalloproteinases in Rabbit Aortic Smooth-Muscle Cell Proliferation', *Biochem J*, 288 (Pt 1) (1992), 93-9.
- 93 K. M. Southgate, D. Mehta, M. B. Izzat, A. C. Newby, and G. D. Angelini, 'Increased Secretion of Basement Membrane-Degrading Metalloproteinases in Pig Saphenous Vein into Carotid Artery Interposition Grafts', *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 19 (1999), 1640-9.

- 94 A. A. Soyombo, G. D. Angelini, A. J. Bryan, B. Jasani, and A. C. Newby, 'Intimal Proliferation in an Organ Culture of Human Saphenous Vein', *Am J Pathol*, 137 (1990), 1401-10.
- 95 A. A. Soyombo, G. D. Angelini, A. J. Bryan, and A. C. Newby, 'Surgical Preparation Induces Injury and Promotes Smooth Muscle Cell Proliferation in a Culture of Human Saphenous Vein', *Cardiovasc Res*, 27 (1993), 1961-7.
- 96 F. G. Spinale, 'Matrix Metalloproteinases: Regulation and Dysregulation in the Failing Heart', *Circ Res*, 90 (2002), 520-30.
- 97 H. C. Stary, A. B. Chandler, R. E. Dinsmore, V. Fuster, S. Glagov, W. Insull, Jr., M. E. Rosenfeld, C. J. Schwartz, W. D. Wagner, and R. W. Wissler, 'A Definition of Advanced Types of Atherosclerotic Lesions and a Histological Classification of Atherosclerosis. A Report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association', *Circulation*, 92 (1995), 1355-74.
- 98 H. C. Stary, A. B. Chandler, S. Glagov, J. R. Guyton, W. Insull, Jr., M. E. Rosenfeld, S. A. Schaffer, C. J. Schwartz, W. D. Wagner, and R. W. Wissler, 'A Definition of Initial, Fatty Streak, and Intermediate Lesions of Atherosclerosis. A Report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association', *Circulation*, 89 (1994), 2462-78.
- 99 S. M. Surowiec, B. S. Conklin, J. S. Li, P. H. Lin, V. J. Weiss, A. B. Lumsden, and C. Chen, 'A New Perfusion Culture System Used to Study Human Vein', *J Surg Res*, 88 (2000), 34-41.
- 100 R. J. Tan, and Y. Liu, 'Matrix Metalloproteinases in Kidney Homeostasis and Diseases', *Am J Physiol Renal Physiol*, 302 (2012), F1351-61.
- 101 R. Tran-Son-Tay, M. Hwang, M. Garbey, Z. Jiang, C. K. Ozaki, and S. A. Berceci, 'An Experiment-Based Model of Vein Graft Remodeling Induced by Shear Stress', *Ann Biomed Eng*, 36 (2008), 1083-91.
- 102 E. D. Verrier, and E. M. Boyle, Jr., 'Endothelial Cell Injury in Cardiovascular Surgery', *Ann Thorac Surg*, 62 (1996), 915-22.
- 103 A. Vineberg, D. D. Munro, H. Cohen, and W. Buller, 'Four Years' Clinical Experience with Internal Mammary Artery Implantation in the Treatment of Human Coronary Artery Insufficiency Including Additional Experimental Studies', *J Thorac Surg*, 29 (1955), 1-32; discussion, 32-6.
- 104 R. Visse, and H. Nagase, 'Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases: Structure, Function, and Biochemistry', *Circ Res*, 92 (2003), 827-39.
- 105 C. Whatling, W. McPheat, and E. Hurt-Camejo, 'Matrix Management: Assigning Different Roles for Mmp-2 and Mmp-9 in Vascular Remodeling', *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 24 (2004), 10-1.
- 106 J. R. Wilentz, T. A. Sanborn, C. C. Haudenschild, C. R. Valeri, T. J. Ryan, and D. P. Faxon, 'Platelet Accumulation in Experimental Angioplasty: Time Course and Relation to Vascular Injury', *Circulation*, 75 (1987), 636-42.

- 107 Y. G. Wilson, A. H. Davies, K. Southgate, I. C. Currie, E. Sheffield, R. N. Baird, P. M. Lamont, and G. D. Angelini, 'Vein Quality Influences Neointimal Hyperplasia in an Organ Culture Model of Human Saphenous Vein', *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 13 (1997), 557-62.
- 108 J. F. Woessner, Jr., 'The Family of Matrix Metalloproteinases', *Ann N Y Acad Sci*, 732 (1994), 11-21.
- 109 N. Zempo, R. D. Kenagy, Y. P. Au, M. Bendeck, M. M. Clowes, M. A. Reidy, and A. W. Clowes, 'Matrix Metalloproteinases of Vascular Wall Cells Are Increased in Balloon-Injured Rat Carotid Artery', *J Vasc Surg*, 20 (1994), 209-17.
- 110 L. Zhang, R. Lukowski, F. Gaertner, M. Lorenz, K. R. Legate, K. Domes, E. Angermeier, F. Hofmann, and S. Massberg, 'Thrombocytosis as a Response to High Interleukin-6 Levels in Cgmp-Dependent Protein Kinase I Mutant Mice', *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 33 (2013), 1820-8.
- 111 Y. Zou, H. Dietrich, Y. Hu, B. Metzler, G. Wick, and Q. Xu, 'Mouse Model of Venous Bypass Graft Arteriosclerosis', *Am J Pathol*, 153 (1998), 1301-10.

7 Abkürzungsverzeichnis

ACB	Aortokoronare Bypassoperation
APS	Ammoniumpersulfat
VBGD	Venous bypass graft disease
ECM	Extrazelluläre Matrix
KHK	Koronare Herzerkrankung
MMP	Matrixmetalloproteinasen
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
PID	Proportional-Integral-Differenziersteuerung
SDS-PAGE	Sodium-dodecyl-sulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SMC	Smooth muscle cell
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TIMP	Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinasen

8 Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

Tabelle 1	Übersicht über die Matrixmetalloproteinasen
Tabelle 2	Komponenten zur Entparaffinierung der Gefäßproben
Tabelle 3	Komponenten der Hämatoxylin-Eosin-Färbung
Tabelle 4	Komponenten des Mastermix für die Umschreibung der RNA in cDNA pro Ansatz
Tabelle 5	Komponenten des Real-Time-quantitative PCR-Ansatz
Tabelle 6	Einstellungen des Light Cyclers für die qRT-PCR
Tabelle 7	Komponenten des Proteinisolationspuffers nach Li et. al
Tabelle 8	Komponenten der Sammel- und Trenngele für die Zymographie
Tabelle 9	Komponenten des Zymographie-Laufpuffers und Sample-Puffers
Tabelle 10	Komponenten des Zymographie-Renaturierungspuffers und des Entwicklungspuffers
Tabelle 11	Komponenten der Coomassie-Färbelösung und der Entfärbelösung
Tabelle 12	Übersicht über die Patientendaten
Tabelle 13	Übersicht über die Matrixmetalloproteinasen
Tabelle 14	Reagenzien für den MTT-Test
Tabelle 15	Reagenzien für die histologischen Untersuchungen
Tabelle 16	Reagenzien für die molekularbiologischen Untersuchungen mittels Zymographie
Tabelle 17	Reagenzien für die molekularbiologischen Untersuchungen mittels qRT-PCR
Tabelle 18	Primer-Sequenzen für die qRT-PCR
Abbildung 1	Domänenstruktur einer Matrixmetalloproteinase am Beispiel des MMP-2 und MMP-9
Abbildung 2	Protokoll der qRT-PCR
Abbildung 3	Phasen der qRT-PCR-Produktakkumulation: Darstellung der gemessenen Fluoreszenz in Abhängigkeit der Zyklenzahl
Abbildung 4	Überprüfung der Spezifität eines Produktes mithilfe der Schmelzkurvenanalyse
Abbildung 5	Eichkurve am Beispiel von β -Actin
Abbildung 6	Rudimentärer Perfusionskreislauf mit Gefäßhalterung und

perfundierter Vene

- Abbildung 7** Datenaufzeichnung des rudimentären Perfusionskreislaufs
- Abbildung 8** Komponenten der Gefäßhalterung
- Abbildung 9** Schematischer Aufbau des artifiziellen Perfusionssystems
- Abbildung 10** Profil der arteriellen Druckkurve bei einem Mitteldruck von 100mmHg
- Abbildung 11** Benutzeroberfläche der Einstellungsmaske
- Abbildung 12** Zwei parallel betriebene artifizielle Perfusionskreisläufe
- Abbildung 13** Kompletter Aufbau des Systems
- Abbildung 14** Morphologische Darstellung des MTT-Assays an repräsentativen Beispielen nach Perfusion mit 10mmHg
- Abbildung 15** Graphische Darstellung der Vitalität der Gefäßproben in Abhängigkeit von der Flussrate
- Abbildung 16** Graphische Darstellung der Vitalität des MTT-Assays der Gruppen A und B
- Abbildung 17** Morphologische Darstellung des MTT-Assays an einem repräsentativen Beispiel nach arterieller Perfusion
- Abbildung 18** Perfusionsprofil der Gruppe A und B
- Abbildung 19** Histomorphologische Darstellung an einem repräsentativem Beispiel: Vergleich zwischen Kontrolle und 1, 3 und 5 Tage venös versus arteriell
- Abbildung 20** Verdeutlichung der histomorphologischen Veränderungen mit Zunahme der intimalen Hyperplasie an repräsentativen vergrößerten Bildausschnitten
- Abbildung 21** MMP-2 Expression nach 1, 3 und 5 Tagen venöser Perfusion
- Abbildung 22** MMP-2 Expression nach 1, 3 und 5 Tagen arterieller Perfusion
- Abbildung 23** Vergleich der Expression von MMP-2 venös versus arteriell nach 1, 3 und 5 Tagen Perfusion
- Abbildung 24** MMP-2-Expression im Vergleich zwischen einem Tag venöser und fünf Tagen arterieller Perfusion
- Abbildung 25** Genexpression von TIMP-1, TIMP-2 und TIMP-4 nach 1, 3 und 5 Tagen venöser Perfusion
- Abbildung 26** Genexpression von TIMP-1 und TIMP-4 nach 1, 3 und 5 Tagen arterieller Perfusion

- Abbildung 27** Genexpression von TIMP-1, TIMP-2 und TIMP-4 venös versus arteriell nach 1, 3 und 5 Tagen Perfusion
- Abbildung 28** Genexpression des MMP-2/TIMP-2-Komplexes nach 1, 3 und 5 Tagen venöser Perfusion
- Abbildung 29** Genexpression des MMP-2/TIMP-2-Komplexes nach 1, 3 und 5 Tagen arterieller Perfusion
- Abbildung 30** Genexpression des MMP-2/TIMP-2-Komplexes venös versus arteriell nach 1, 3 und 5 Tagen Perfusion
- Abbildung 31** Genexpression des MMP-2/TIMP-2-Komplexes arteriell/venös nach 1, 3 und 5 Tagen Perfusion
- Abbildung 32** Repräsentative Gelatine-Zymographie der einzelnen Perfusionsprofile in Abhängigkeit von der Perfusiondauer.
- Abbildung 33** Vergleich der Gesamtaktivität von MMP-2 nach 1, 3 und 5 Tagen venöser Perfusion
- Abbildung 34** Vergleich der Gesamtaktivität von MMP-2 nach 1, 3 und 5 Tagen arterieller Perfusion
- Abbildung 35** Vergleich der Gesamtaktivität von MMP-2 venös versus arteriell nach 1, 3 und 5 Tagen Perfusion
- Abbildung 36** Gesamtaktivität von MMP-2 nach 1, 3 und 5 Tagen Perfusion
- Abbildung 37** Vergleich der Expression von aktivem MMP-2 venös versus arteriell nach 1, 3 und 5 Tagen Perfusion

9 Anhang

9.1 Patientendaten

Tabelle 12: Übersicht über die Patientendaten

Vene (Nr.)	Patientenalter (Jahre)	Geschlecht (m/w)	Größe (cm)	Gewicht (kg)	BMI (kg/m ²)	Blutdruck (mmHg)	Gesamtcholesterin (mg/dl)	HDL-Cholesterin (mg/dl)	LDL-Cholesterin (mg/dl)	Blut-Zucker (mg/dl)
1	63	m	178	86	27,1	135/80	266	57	185	112
2	78	m	172	91	30,8	140/85	211	46	142	108
3	74	m	176	78	25,2	135/70	245	49	155	102
4	69	m	183	94	28,1	145/90	265	42	178	122
5	86	m	182	95	28,7	140/80	236	54	183	113
6	73	m	178	87	27,5	150/85	276	44	166	98
7	81	f	157	68	27,6	125/85	252	38	154	121
8	66	m	173	78	26	135/75	216	43	179	116
9	75	m	186	115	33,2	*	*	*	*	*
10	69	f	166	78	28,3	140/75	265	46	162	114
11	73	m	178	85	26,8	130/85	253	34	140	126
12	77	m	182	78	23,5	135/95	264	44	162	89
13	79	m	168	72	25,5	160/85	278	48	175	117
14	69	f	172	78	26,4	130/80	269	58	138	105
15	81	f	154	74	31,2	135/85	231	32	142	102
16	79	m	184	96	28,4	145/90	242	41	187	112
17	74	m	178	86	27,1	135/75	246	47	163	121
18	62	f	168	75	26,6	145/65	244	43	159	96
19	68	m	174	78	25,8	145/85	264	52	144	106
20	79	m	176	83	26,8	130/70	248	56	172	94
21	73	m	181	106	32,4	135/75	243	36	158	114
22	83	f	162	67	25,5	155/95	263	38	132	103
23	66	m	178	88	27,8	135/75	254	41	179	117
24	73	f	163	73	27,5	130/85	256	49	164	124
25	78	m	174	78	25,8	*	*	*	*	*
26	74	m	178	89	28,1	145/95	241	57	146	102
27	83	m	186	84	24,4	115/75	265	32	164	121
28	74	m	176	86	27,8	135/95	272	54	168	116
29	67	f	166	76	27,6	120/85	254	46	154	94
30	65	m	174	85	28,1	155/90	283	43	176	97
31	78	m	192	118	32	125/75	247	47	166	127
32	72	f	164	86	32	135/80	254	49	158	105
33	68	m	176	82	26,5	135/85	257	28	174	93
34	79	m	178	86	27,1	150/85	266	47	169	124
35	74	m	180	94	29	135/75	262	42	178	106

Alter Gesamtkollektiv (n=35): 73,77 Jahre; Stabw.: 6,03

Alter Männer (n=26): 74,04 Jahre; Stabw.: 5,71

Alter Frauen (n=9): 73 Jahre; Stabw.: 7,22

*: Daten nicht vorhanden

9.2 Übersicht über die Matrixmetalloproteinasen

Tabelle 13: Übersicht über die Matrixmetalloproteinasen (Spinale, 2002)

Subklasse	Name	Synonym	Größe	Substrate und Eigenschaften
Kollagenasen	MMP-1	Kollagenase-1	57kDa	Spaltet Kollagen Typ I, II, III, VII, X spezifisch an einer einzigen Peptidbindung, so dass Fragmente mit $\frac{1}{4}$ bzw. $\frac{3}{4}$ Länge des ursprünglichen Kollagens entstehen
	MMP-8	Kollagenase-2	91kDa	Kollagen Typ I, II, III, VII, X
	MMP-13	Kollagenase-3	54kDa	Kollagen Typ I, II, III, VII, X
	MMP-19	RASI-1, MMP-1	57kDa	Gelantine; fungiert als Autoantikörper bei Rheumatoiden Arthritis
Gelatinasen	MMP-2	Gelatinase A	72kDa	Gelantin Typ I, IV, V, X, Laminin V
	MMP-9	Gelatinase B	92kDa	Gelantin Typ I, IV, V, X, Laminin V
Stromalysine	MMP-3	Stromelysine 1	59kDa	Kollagene Typ III, IV, IX, Gelatin, Laminin, Proteoglykane
	MMP-7	Matrilysin	28kDa	Gelatin, Fibronectin
	MMP-10	Stromelysine 2	53kDa	Kollagen Typ III, IV, IX, Gelatin, Laminin, Proteoglykane
	MMP-11	Stromelysine 3	55kDa	α -1-Antiprotease
	MMP-12	Metalloelastase	54kDa	Elastin
	MMP-26	Matrilysin 2		unbekannt

Membran-Typ-MMPs	MMP-14 MMP-15 MMP-16 MMP-17 MMP-24 MMP-25	MT1-MMP MT2-MMP MT3-MMP MT4-MMP MT5-MMP MT6-MMP	66kDa	Können MMP-2 und MMP-13 aktivieren MT1,2,3, und 5-MMP besitzen eine transmembranäre Domäne und einen zytoplasmatischen Anteil mit regulativer Funktion für die MMP-Aktivität; MT4- und MT6-MMP gehören zu den GPI (Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol)-verankerten Proteine
Andere	MMP-4	Telopeptidase	35kDa	Spaltet Kollagen Typ I am C-terminalen Ende, Fibronectin
	MMP-5	$\frac{3}{4}$ -Kollagen-Endopeptidase	54kDa	Verdaut Fragmente von $\frac{3}{4}$ Länge, die nach Spaltung von Kollagen Typ I, II und III durch Kollagenasen entstehen.
	MMP-6	Saure Metalloproteinase	55kDa	Spaltet Proteoglykane i
	MMP-20	Enamelysin	54kDa	Vorkommen nur im Zahnschmelz
	MMP-23	CA-MMP		Besitzt kein Signalpeptid; ist zell-assoziiert; hohe Expression in reproduktivem Gewebe
	MMP-28	Epilysin		hohe Expression im Hoden

9.3 Reagenzien und Geräte für die molekularbiologischen Untersuchungen

9.3.1 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid-Assay (MTT-Test)

Tabelle 14: Reagenzien für den MTT-Test

MTT-Lösung	Stocklösung (5mg/ml in PBS) 1ml 1:10 Verdünnung mit serumfreiem Medium/Gefäßprobe
------------	---

9.3.2 Histologie

Tabelle 15: Reagenzien für die histologischen Untersuchungen

Clear Rite 1 Clear Rite 2	Sigma Aldrich Chemie, Taufkirchen, Deutschland.
Ethanol	
Hämatoxylin nach Mayer	
saures Ethanol (1ml HCl, 37% + 400ml 70% Ethanol)	
Eosin-B-Lösung	
Eukitt	

9.3.3 Zymographie

Tabelle 16: Reagenzien für die molekularbiologischen Untersuchungen mittels Zymographie

Proteinisolationspuffer nach Li et. al	10mM Cacodyl-Säure, pH 5,0 150mM NaCl 1µM ZnCl 1,5mM NaN ₃ 0,01% (v/v) Triton X-100 20mM CaCl ₂
10xLaufpuffer	0,25M Trizma Base (Sigma, Taufkirchen, D.) 1,92M Glycin 10% (w/v) <u>S</u> odium <u>d</u> odecyl <u>s</u> ulfate, SDS (Invitrogen, Karlsruhe, D.)
2xSample-Puffer	12,5% (v/v) 0,5M Tris-HCL pH 6,8 25% (v/v) Glycerol 10% (w/v) <u>S</u> odium <u>d</u> odecyl <u>s</u> ulfate, SDS (Invitrogen, Karlsruhe, D.) 1% Bromphenolblau
Renaturierungspuffer	100mM Triton X-100
Entwicklungspuffer	50mM Trizma Base (Sigma, Taufkirchen, D.) 200mM NaCl 5mM CaCl ₂ 0,02% Brij-35
Färbelösung	40% (v/v) Methanol 10% (v/v) Essigsäure 0,5% Coomassie-brilliant-blue R-250
Entfärbelösung	40% (v/v) Methanol 10% (v/v) Essigsäure
Marker	Precision Plus Protein Standard Dual Color (BioRad, München, D.)

9.3.4 Quantitative-Real-Time Polymerase-Chain-Reaction (qRT-PCR)

Tabelle 17: Reagenzien für die molekularbiologischen Untersuchungen mittels qRT-PCR

RNA-DNA-Proteinisolationskit	peqGold-TriFast (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, D.) DNA-free Kit (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, D.)
Umschrieb der RNA in cDNA	Omniscript® RT Kit (Qiagen, Hilden, D.) 10x Buffer RT 5mM dNTP Mix Omniscript Reverse Transcriptase 4units (per 20µl reaction) 250ng/µl Random Hexamer Primer RNase-freies Wasser
qRT-PCR Kit	QuantiTect SYBR-Green PCR-Kit (Qiagen, Hilden, D.) 2x QuantiTect SYBR Green RNase-freies Wasser
Bovine Serum Albumin, BSA	(Sigma, Taufkirchen, D.)
qRT-PCR Primer	MWG, Biotech, Ebersberg, D. 5µM Primer Forward 5µM Primer Reverse

qRT-PCR Primer:

Tabelle 18: Primer-Sequenzen für die qRT-PCR

Gen	Primer-Sequenz (5'>3')	Größe des PCR-Produktes (bp)
β-Actin forward	5`-ccaaccgcgagaagatga-3`	96
β-Actin reverse	5`-ccagaggcgtacagggatag-3`	
TIMP-1 forward	5`-cagcaaaaggccttcgtaaa-3`	72
TIMP-1 reverse	5`-tggctgaacagggaacact-3`	
TIMP-2 forward	5`-caggttacgctggaattgaca-3`	74
TIMP-2 reverse	5`-gactgacctggaatgacgatg-3`	
TIMP-4 forward	5`-agggagagcctgaatcatca-3`	
TIMP-4 reverse	5`-gcactgcatagcaagtgggtg-3`	84
MMP-2 forward	5`-tgctggagacaaattctgga-3`	
MMP-2 reverse	5`-gatggcattccaggcatc-3`	90

9.3.5 Geräte und Materialien

- Wasserbad (Thermo Boy, Eurofins MWG, Ebersberg, Deutschland)
- Biokompatibler Kunststoff (PEEK medical grade, Invibio, Deutschland)
- Glaszylinder (Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co KG, München, Deutschland)
- Thermostabile biokompatible Silikonschläuche (Silikonschlauch Versilic®, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- Drucksensoren (DPT-9300, Codan Critical Care, Forstinning, Deutschland)
- Rollerpumpe (Ismatec S2, Wertheim, Deutschland)
- Perfusionsmedium DMEM/Ham`s F-12 (PAA, Marburg, Germany)
- Perfusorpumpe (MC Medizintechnik GmbH, Alzenau, Deutschland)
- Nahtmaterial (Ethibond Vicryl 3-0, Ethicon GmbH, Norderstedt, Deutschland)
- Laminar Airflow Hood (NuAire, Plymouth, Minnesota)
- Einbettautomat (Microm-Thermo Scientific, Walldorf, Deutschland)
- Schlittenmikrotom (Microm-Thermo Scientific, Walldorf, Deutschland)
- Homogenisator (Precellys 24, Peqlab Biotechnologie GmbH)
- Kühlzentrifuge 5810 R (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
- Thermocycler C1000 (Biorad, München, Deutschland)
- Light Cycler 1.5 (Roche, Mannheim, Deutschland)
- Mikrowaage (Sartorius, Göttingen, Deutschland)
- Biophotometer (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
- MiniProtean-3-Elektrophorese-System (Biorad, München, Deutschland)

10 Danksagung

An erster Stelle will ich meinen Liebsten danken: meinen Eltern und meinen Geschwistern, die mich immer in allen Belangen unterstützten und mir zur Seite standen.

Herrn Prof. Dr. Rüdiger Lange danke ich für die Möglichkeit und Unterstützung innerhalb seiner Abteilung diese Arbeit anfertigen zu dürfen. Dank seiner Unterstützung und Förderung war es mir möglich wertvolle Erfahrungen sammeln zu können.

An nächster Stelle will ich Markus Krane als Betreuer und für die Vergabe der Arbeit danken, für die stete Gesprächsbereitschaft, zahlreiche anregende Diskussionen und guten Hinweise für ein hilfreiches Fortschreiten der Arbeit.

Ein ausgesprochen großer Dank gilt Harald Lahm, Stefan Eichhorn und Sara Dummler, welche durch Ihre große Hilfsbereitschaft und das außerordentliche Engagement, für einen erfolgreichen Abschluss dieser Arbeit sorgten.

Christian Becker danke ich für die beispiellose Unterstützung und Betreuung bei Software- und Technikproblemen und der hervorragenden Programmierung einer Benutzeroberfläche.

Martina Dreßen und Steffi Doppler danke ich für die tatkräftige Unterstützung und zahlreichen Tips und Tricks bei der Laborarbeit.

Zu guter Letzt danke ich für sachliche und fachliche Unterstützung sowie lustige Diskussionen Angelika Bernhard, Sofie Dorn und Ursula Ettner.

Eine Liste der Personen, die zum Gelingen der Arbeit beitragen, wird niemals vollständig sein. Jedes Gespräch über die Arbeit gibt Impulse. Ich möchte allen oben Genannten, und denen, die ich leider vergessen habe, und es trotzdem verdient haben, meinen herzlichen Dank für eine wunderschöne Zeit aussprechen.